
BACHELORARBEIT

Frau
Christin Lembke

**Analyse ausgewählter
mitochondrialer SNPs zur
Haplogruppentypisierung von zwei
Bevölkerungsgruppen aus Ost-
und Westafrika**

Mittweida, 2014

BACHELORARBEIT

Analyse ausgewählter mitochondrialer SNPs zur Haplogruppentypisierung von zwei Bevölkerungsgruppen aus Ost- und Westafrika

Autor:
Frau

Christin Lembke

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI09w3-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde

Zweitprüfer:
OA Dr. med. Karlheinz Thiele

Einreichung:
Mittweida, 28.03.2014

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2014

Bibliographische Beschreibung:

Lembke, Christin: *Analyse ausgewählter mitochondrialer SNPs zur Haplogruppentypisierung von zwei Bevölkerungsgruppen aus Ost- und Westafrika.* - 2014. – 44 Seiten, 11 Abbildungen, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/ Naturwissenschaften/ Informatik, Bachelorarbeit, 2014

Englischer Titel:

Analysis of selected mitochondrial SNPs for haplogroup classification of demographic groups from East and West Africa.

Kurzbeschreibung:

Ziel der Arbeit ist es die DNA-Isolate von Teilen der Bevölkerungsgruppen aus Ghana (Ewe) und Äthiopien (Amharen) bezüglich ausgewählter mitochondrialer *Single nucleotide Polymorphisms* (mtSNPs) zu untersuchen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden anhand vorliegender DNA-Isolate autosomale STR- und z.T. Y-STR Analysen durchgeführt. Die Erkenntnisse aus den STR-Analysen sollen nun durch Absichten einer populationsgenetischen Studie anhand von mtDNA-Analysen an einem umfangreichen Probenset durchgeführt werden. Das mtSNP-System, sowie die Durchführung basieren auf Teilinformationen der Veröffentlichung von Paneto et al. aus dem Jahr 2011. Die Auswertung der mtSNP-Profile erfolgt mittels eines bereits publizierten Multiplexsystems zur Haplogruppenklassifikation.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Prof. Dr. Dirk Labudde und OA Dr. med. Karlheinz Thiele. Mein spezieller Dank gebührt Frau Anne-Marie Pflugbeil, die mich während der gesamten Arbeit begleitete und mir dabei mit Erfahrung, Wissen und Ihrer fachlichen Betreuung zur Seite stand. Des Weiteren danke ich Frau Maria Harthun für die gute Zusammenarbeit.

Ein großer Dank gebührt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, die mir während der Studienzeit und der Erstellung der Arbeit ihre Unterstützung und Geduld schenkten.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Mitochondriale DNA	1
1.1.1 Struktur und Besonderheiten	1
1.1.2 Vererbungsmechanismus mitochondrialer DNA	3
1.2 Populationsgenetische Hintergründe	4
1.3 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	5
1.4 DNA-Extraktion	6
1.4.1 Chelex-Extraktionsmethode	6
1.4.2 Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung (PCI).....	7
1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	8
1.5.1 Einzelbasenverlängerung (SNaPshot-PCR)	8
1.6 Kapillarelektrophorese	9
2 Zielstellung.....	12
3 Material	13
3.1 Geräte und Software.....	13
3.2 Verbrauchsmaterialien	14
3.3 Verbrauchslösungen	14
3.4 Primer.....	15
3.4.1 Mutlplex-PCR-Primer	15
3.4.2 SNaPShot-PCR-Primer	15
3.5 Untersuchungsmaterial	16
4 Methoden	17
4.1 Bestandsaufnahmen	17
4.2 DNA-Qualitätstests und Primeranalyse	17
4.2.1 gDNA-Untersuchung mittels S5-Powerplex-Analyse	17

4.2.2 mtDNA-Voranalysen mittels verschiedener SNP-Systeme.....	18
4.2.3 Primeranalyse (Paneto et al.)	20
4.3 mtSNP-Analyse (Paneto et al.).....	21
4.3.1 Multiplex-PCR ausgewählter mtSNP-Positionen.....	22
4.3.2 Enzymatische Aufreinigung der Multiplex-PCR-Produkte.....	24
4.3.3 SNaPshot-PCR (SBE-Reaktion)	24
4.3.4 Detektion mitochondrialer SNPs mittels Kapillarelektrophorese	25
4.4 Haplogruppenklassifikation	27
5 Ergebnisse.....	29
5.1 Vorversuche und Fehleranalyse/Optimierung	29
5.1.1 Qualitätsuntersuchungen von gDNA und mtDNA	29
5.1.2 Testung der neuen Analyse-Primer im Singleplex- und Multiplexverfahren	30
5.2 Analysen des mtSNP-Systems.....	32
5.3 Haplogruppenklassifikation	34
6 Diskussion.....	36
6.1 Vorversuche und Fehleranalyse/Optimierung	36
6.2 Analysen des mtSNP-Systems.....	37
6.3 Haplogruppenklassifikation	38
7 Zusammenfassung und Ausblick	39
Literaturverzeichnis	40
Anhang	42
Selbstständigkeitserklärung	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das mitochondriale Genom [modifiziert nach Butler, 2011]	3
Abbildung 2: Ablauf Einzelbasenverlängerung (SNaPshot-Methode).....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophorese [Pflugbeil, 2012]	11
Abbildung 4: schematischer Ablauf der mtSNP-Analyse	22
Abbildung 5: Haplogruppen (Hg) Klassifikationsbaum [Paneto et al., 2011]	28
Abbildung 6: Elektropherogramm der mtDNA-Qualitätsuntersuchung [Vallone et al., 2004]	29
Abbildung 7: Funktionalitätsanalyse der Primer am Beispiel eines DNA-Isolates aus Äthiopien.....	31
Abbildung 8: Multiplexamplifikation mit einem mtSNP-System für 8 Loci	32
Abbildung 9: Multiplexamplifikation mit Heteroplasmie	33
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Makrohaplogruppen	34
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Hg-Verteilung für den afrikanischen Raum	35
Abbildung 12: Eingesetzte SNaPshot-PCR-Primer [Paneto et al., 2011]	44
Abbildung 13: Ergebnisse der Kapillarelektrophorese	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	13
Tabelle 2: Gerätesoftware	13
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	14
Tabelle 4: Chemikalien zur gDNA- und mtSNP-Analyse	14
Tabelle 5: Präamplifikationsansatz PowerPlex®S5-Kit [Pflugbeil, 2012]	18
Tabelle 6: Amplifikationsprotokoll PowerPlex® S5-Kit [Pflugbeil, 2012].....	18
Tabelle 7: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012].....	19
Tabelle 8: Amplifikationsbedingungen Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012].....	19
Tabelle 9: Reaktionsansatz SNaPshot-PCR [Pflugbeil, 2012]	19
Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen der Einzelbasenverlängerung [Pflugbeil, 2012]	20
Tabelle 11: Multiplex-PCR-Amplifikationsprotokoll [nach Paneto et al., 2011].....	21
Tabelle 12: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012].....	23
Tabelle 13: Amplifikationsbedingungen der Multiplex-PCR.....	23
Tabelle 14: farbliche Markierung der verwendeten ddNTPs	24
Tabelle 15: Reaktionsmix der SNaPshot-PCR [nach Pflugbeil, 2012]	25
Tabelle 16: Amplifikationsbedingungen der SNaPshot-PCR.....	25
Tabelle 17: Vorbereitung der Proben für den Sequenzer (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer)	26
Tabelle 18: Parameter für den Lauf [Pflugbeil, 2012]	26
Tabelle 19: Eingesetzte Multiplex-Primer [Paneto et al., 2011].....	42

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aDNA	alte DNA
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EXO I	Exonuklease I
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
HVS	Hyper Variable Segment
KE	Kapillarelektrophorese
mtDNA	mitochondriale DNA
mtSNP	mitochondrialer Single Nucleotide Polymorphism
PCI	Phenol-Chloroform/ Isoamylalkohol
PCR	Polymerase chain reaction
rCRS	revised Cambridge Reference Sequence
RFU	Relative Fluorescence Unit
rRNA	ribosomale RNA (Ribonukleinsäure)
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBE	Single Base Extension
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STR	Short Tandem Repeat

T	Thymin
tRNA	transfer RNA
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Die molekulargenetische Forensik ist ein Fachgebiet, welches auf stete Weiterentwicklungen effektiver Untersuchungsmethoden angewiesen ist. In diesem Gebiet finden die Analysen auf Basis der DNA statt. Dabei gibt es viele Untersuchungsmethoden, die mithilfe genomischer DNA (Zellkern-DNA) durchgeführt werden, wobei die Arbeit mit mitochondrialer DNA eine Nische darstellt. Obwohl die STR-Analysen an genomischer DNA oftmals eine höhere Diskriminationskraft besitzen, weist die mitochondriale DNA ebenfalls einige signifikante Stärken auf, die das wettmachen. Durch die Analyse von biallelischen Markern, den mitochondrialen Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) können wertvolle Erkenntnisse für populationsgenetische Studien erhalten werden. Dabei kann die mitochondriale DNA bei der Ahnenrückverfolgung oder einer Haplogruppenklassifikation behilflich sein. Mittels der Haplogruppen können bei einem ausreichend großen Datensatz Stammbaumrückverfolgungen vorgenommen und so dem Wanderungsverhalten der Menschheit auf die Spur gegangen werden.

1.1 Mitochondriale DNA

1.1.1 Struktur und Besonderheiten

Eukaryotische Zellen besitzen neben der genomischen (chromosomalen) DNA, ihrem Haupt-Genom im Zellkern, noch zusätzlich extrachromosomale DNA, die mitochondriale DNA (mtDNA). Im Jahr 1963 wurde die mtDNA erstmals biochemisch nachgewiesen und hat seitdem für die molekulare und forensische Genetik zunehmend an Interesse und Bedeutung gewonnen. Die humane mtDNA-Sequenz wurde erstmals 1981 vollständig sequenziert und 18 Jahre später um 11 Fehler korrigiert [Anderson et al., 1981]. Diese Sequenz liegt nun als sogenannte revised Cambridge Referenzsequenz (rCRS) vor und wird als Vergleichssequenz bei Sequenzanalysen verwendet. Jede Zelle ist mit 100 bis 1000 mtDNA-Kopien ausgestattet, d.h. sie liegt stark redundant vor. Diese hohe Kopienzahl begünstigt einen Erfolg auf der Grundlage von älterem oder historischem Probenmaterial mit einem hohen Grad an DNA-Degradation. Die mitochondriale DNA weicht in ihrer Genetik deutlich von der genomischen DNA ab. So weist sie im Molekül eine viel höhere Mutationsrate auf, was zu einer sehr viel höheren Sequenzvariabilität führt. Dieser Grad an Variabilität ist unter anderem bei forensischen Untersuchungen von großem Interesse. Außerdem ist die mtDNA ein zirkuläres, doppelsträngiges,

geschlossenes DNA-Molekül und besteht aus ca. 16.568 Nukleotiden (Abbildung 1). Die beiden Stränge wurden als H- („heavy“) und L-Strang („light“) eingeteilt. Diese Einteilung beruht auf der bei der Dichtezentrifugation ermittelten unterschiedlichen Dichte der beiden molekülbildenden Stränge. Dabei besitzt der H-Strang eine höhere Anzahl an Guanin-Nukleotiden, welche die größte molekulare Masse von allen vier Nukleotiden aufweisen [Ganten, Ruckpaul, 2008].

Auf dem mitochondrialen Genom sind insgesamt 37 Gene kodiert, welches sich aus 13 proteinkodierenden Genen, zwei rRNA-Genen, sowie 22 tRNA-Genen zusammensetzt. Der Großteil der mitochondrialen Gene (28) ist auf dem H-Strang kodiert. Die genkodierenden Regionen grenzen direkt aneinander und zwischen den mitochondrialen Genen finden sich im Gegensatz zum nukleären Genom keine Intron-Sequenzen. Des Weiteren ist auf der mtDNA die nichtkodierende Kontrollregion, auch D-loop genannt, lokalisiert. In diesem Bereich befinden sich drei hochpolymorphe Regionen (HVSI, HVSII, HVSIII), auch hypervariable Regionen genannt. Die beiden mtDNA-Stränge werden asynchron repliziert. Außerdem funktioniert der mitochondriale genetische Apparat nicht autonom, sondern steht ebenfalls unter dem Einfluss des Kerngenoms [Butler, 2011].

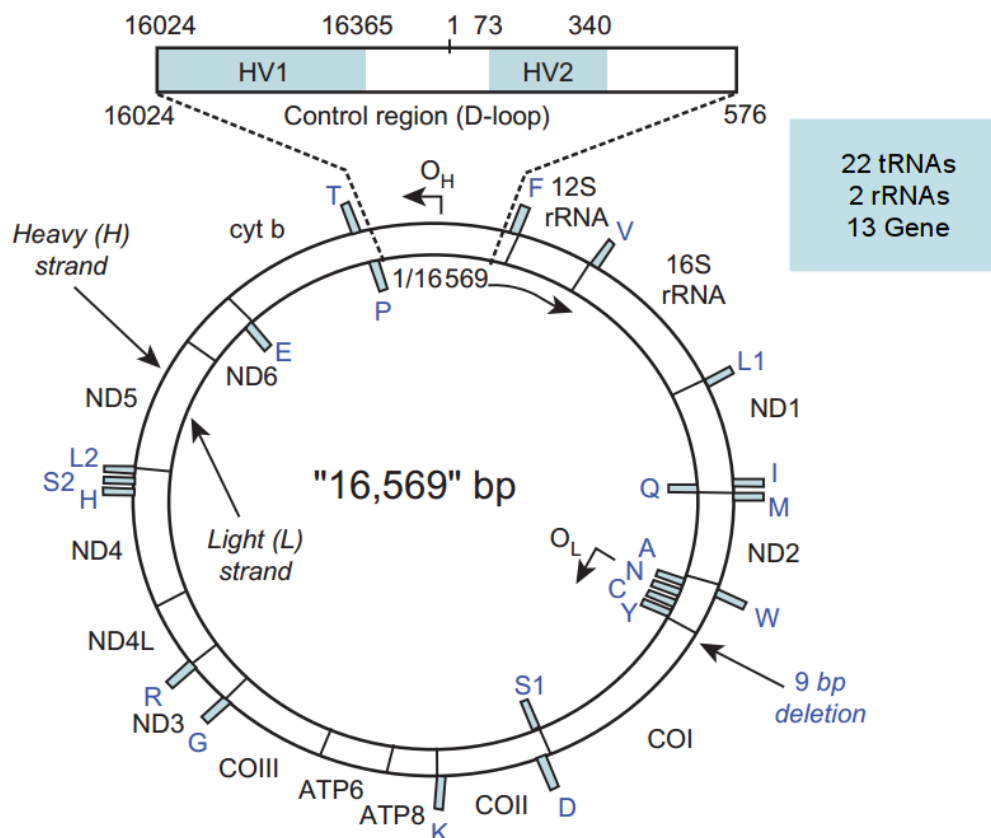


Abbildung 1: Das mitochondriale Genom [modifiziert nach Butler, 2011]

Die vorliegende Abbildung zeigt das mitochondriale, zirkuläre Genom. Der äußere Strang wird als H-Strang (heavy-strand) bezeichnet und kodiert 28 der insgesamt 37 mitochondrialen Gene. Dieser weist einen höheren Anteil an GC-Nukleotiden als der L-Strang (light-strand) auf. Im oberen Bereich der Abbildung befindet sich die Kontrollregion (D-loop), dargestellt mit den hypervariablen Regionen I (HVSI) und II (HVSII). Rund um das mtGenom sind durch entsprechende Abkürzungen die Protein- und RNA-kodierenden Regionen markiert. Durch Deletionen und Insertionen kann es zu Abweichungen von der ursprünglichen Größe des mtGenoms von 16.569 Basenpaaren (bp) kommen.

1.1.2 Vererbungsmechanismus mitochondrialer DNA

Eine mtDNA-Analyse kann in Fällen, in denen die Analyse der genomischen DNA (gDNA) nicht mehr möglich ist, wichtige Erkenntnisse liefern. Die Aussagekraft der Untersuchung des Kern-Genoms ist zwar höher als die der mtDNA, allerdings bringt die mtDNA andere Vorteile mit sich. Aufgrund ihrer hohen Kopienanzahl, mit der die mtDNA in den Zellen vorliegt und einer hohen Stabilität gegenüber Degradation, besitzt die mtDNA-Analyse vor allem bei Proben mit geringem genetischen Material oder bereits degradiertem Material einen großen Vorteil. Die Vererbung des mitochondrialen Genoms wird als asexueller Prozess beschrieben, da die Weitergabe ausschließlich klonal erfolgt. Die maternale Weitergabe wird vor allem durch die

höhere Anzahl an Mitochondrien im Plasma der Eizelle begünstigt. Des Weiteren verhindern physikalische Barrieren das Eindringen der väterlichen Mitochondrien in die Eizelle [Ganten, Ruckpaul, 2008]. Es ist bisher nur ein Fall bekannt, bei dem die paternale Transmission nachgewiesen werden konnte [Schwartz, Vissing, 2002].

Obwohl die mtDNA einige Reparaturmechanismen besitzt, wie sie auch bei der gDNA vorkommen, weist die mtDNA eine deutlich höhere Mutationsrate auf als die Kern-DNA. Die Mutationsereignisse selbst sind hochkonserviert und werden von Generation zu Generation weitergegeben. Aufgrund der uniparentalen Weitergabe dieser hochkonservierten Mutationen, können mithilfe der mtDNA unter anderem konsistente Stammbaumrückverfolgungen durchgeführt werden. Daher lassen sich mit der mtDNA-Analyse auch Rückschlüsse auf die Populationsentwicklung der Menschen ziehen [Parson, 2009].

1.2 Populationsgenetische Hintergründe

Eine Gruppe von Individuen, die eine Gemeinschaft bilden, sich fortpflanzen können und sich im gleichen geographischen Raum aufhalten, kann als Population beschrieben werden. Jedoch muss der Begriff „Population“ und dessen Bezug zu Beginn klar definiert werden, um Ergebnisse korrekt evaluieren zu können. In dieser wissenschaftlichen Arbeit bezieht sich der Populationsbegriff nur auf das ausgewählte Probenet. Der Genpool innerhalb einer Population beziehungsweise zwischen Populationen kann dabei diverse Unterschiede aufweisen, die durch Mutationen oder auch Selektion begründet sind. Die Untersuchung und Analyse der genetischen Unterschiede hilft dabei die menschliche Entwicklung und Evolution nachzuvollziehen, trägt jedoch auch zum Verständnis verschiedener Erkrankungen bei [Buselmaier, Tariverdian, 2006]. Mithilfe der molekulargenetischen Phylogenie kann auf Basis verschiedener molekularer Marker die menschliche Stammesgeschichte rekonstruiert werden. Dabei ist die große Anzahl an genetischen Merkmalen, die untersucht werden können, ein großer Vorteil [Knoop, Müller, 2009].

Für populationsgenetische Studien ist vor allem auch mitochondriale DNA sehr interessant. Zwar weist die genomische DNA aufgrund der Mischung des maternalen und paternalen Erbguts, sowie des Rekombinationsverhaltens eine höhere Diskriminationskraft auf, jedoch besitzt mtDNA ebenfalls einige, bereits in vorhergehenden Kapiteln genannte, methodische Stärken. Da mtDNA ausschließlich maternal vererbt wird, können weitere Rückschlüsse zur Populationsgeschichte des Menschen gezogen werden. Durch die Sequenzvariabilität und gemeinsam auftretender Mutationen wird es möglich, die einzelnen mitochondrialen Genome der Individuen in Haplotypen einzuteilen [Parson, 2009].

Dabei können Haplotypen, die die gleiche Ausprägung an Sequenzpolymorphismen aufweisen, einer Haplogruppe zugeordnet werden. Diese mitochondrialen Haplogruppen können genutzt werden um eine Klassifikation in Haplogruppen vorzunehmen. Dabei ist anzumerken, dass diese Haplogruppen oftmals geographisch zugeordnet werden können. Laut der „Out-of Africa-Hypothese“ haben die Haplogruppen ihren Ursprung in Afrika [Ganten, Ruckpaul, 2008], wobei die ältesten Haplogruppen L0, L1 und L3 sind. Aus diesen Haplogruppen leiten sich weitere Makrohaplogruppen ab. Die einzelnen Verzweigungen im mitochondrialen-Haplogruppenbaum kann man oftmals den einzelnen Kontinenten zuordnen. Aus der Haplogruppe L3 entspringen die Makrohaplogruppen für den europäischen Kontinent und bilden eigene weitere Verzweigungen [URL-1].

1.3 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Das menschliche Genom umfasst ca. 3,2 Milliarden Basenpaare. Dabei sagt man, dass bei zwei beliebig ausgewählten Personen sich die Genome lediglich um 0,01% unterscheiden. Dem geringen Unterschied liegen Variationen in der DNA-Sequenz zu Grunde. Diese geringfügige Veränderung der Erbinformation innerhalb von Populationen wird auch als Polymorphismus bezeichnet. Sehr häufig auftretende DNA-Polymorphismen sind die sogenannten SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) und STRs (*Short Tandem Repeats*). Man sagt, dass jede Person Millionen an SNPs aufweist. Diese hohe Anzahl lässt vermuten, dass SNPs zur Individuen-Unterscheidung auf molekularer Ebene herangezogen werden können. Ein SNP entsteht durch den Austausch von einzelnen Nukleotiden in der DNA-Sequenz. Dieser Einzelbasenaustausch ist mit einer Punktmutation zu vergleichen, jedoch weist eine Punktmutation eine deutlich geringere Häufigkeit auf. Da SNPs nur sehr selten in mehreren Allelzuständen vorliegen, handelt es sich größtenteils um biallelische Marker, die nicht gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt sind. Weiterhin weisen SNPs eine sehr geringe Mutationsrate von 10^{-8} auf, das heißt es liegen hier hochkonservierte Mutationsereignisse vor.

SNPs können grundlegend in vier Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe beinhaltet SNPs für eine Identifikation von Personen, die Gruppen zwei und drei umfassen SNP-Marker die zur Ahnenforschung und für Abstammungsuntersuchungen herangezogen werden können. Die vierte Gruppe setzt sich aus SNPs zusammen, die der phänotypischen Einordnung von Individuen dienen können [Budowle, van Daal, 2008].

In der spurenkundlichen forensischen Analyse und auch für Abstammungsbegutachtungen werden vor allem STRs als molekulare Marker bei DNA-

Untersuchungen verwendet. STRs sind relativ kurze, sich auf der DNA-Sequenz wiederholende Nukleotidabfolgen. Jedoch bringt die Untersuchung von SNPs auf der Grundlage der mitochondrialen DNA in forensischer Hinsicht einige Vorteile mit sich. Aufgrund der Vererbung in uniparentaler Linie, hier in maternaler Linie, wird zum einen die geographische und auch ethnische Einordnung vereinfacht. Es können konsistente Stammbaumrückverfolgungen durchgeführt werden. Zum Anderen sind mitochondriale SNPs (mtSNPs) für forensische DNA-Analysen vor allem wegen ihres Größenunterschiedes gegenüber anderen molekularen Markern (z.B. STRs) von großem Interesse. Da hier lediglich eine veränderbare Nukleotidposition betrachtet werden muss, werden für die Analysen ebenfalls nur sehr kleine Teilsequenzen herangezogen. Im Gegensatz zu STRs (300-400 bp), sind SNPs-Amplikons mit einer Moleküllänge von maximal 100 Basepaaren (bp) deutlich kleiner und somit hervorragend für eine Analyse von altem, bereits degradiertem DNA-Material geeignet. Allerdings ist es notwendig eine höhere Anzahl an SNP-Positionen zu analysieren, um die Diskriminationskraft zu erhöhen und ein eindeutiges Profil zu erhalten. Dabei wird gesagt, dass 25 bis 45 SNP-Positionen nötig sind, um die gleiche Aussagekraft, wie von 13 STRs zu erhalten. Zusammengefasst werden 50 bis 100 SNP-Loci als Marker benötigt, um den gleichen Informationsgehalt wie von 10 bis 16 STR-Markern zu erreichen [Butler, 2011].

Daher ist es von Interesse, zuverlässige Methoden zur Verfügung stehen zu haben, die die Analyse einer Anzahl an SNP-Positionen aus einer DNA-Probe ermöglichen. Die gleichzeitige Amplifikation von einem ausreichenden Set an SNPs, mithilfe eines zuverlässigen Multiplexsystems, stellt daher die größte Herausforderung dar.

1.4 DNA-Extraktion

1.4.1 Chelex-Extraktionsmethode

Die Chelex-Extraktionsmethodik ist eine Kochlyse mit der Chemikalie Chelex, bei der DNA aus den Zellen extrahiert wird. Diese DNA-Extraktionsmethode beruht darauf die Zellen durch das Kochen der vorliegenden Probe aufzubrechen und somit die DNA freizugeben. Nach dem Aufbrechen der Zelle liegt DNA frei vor und ist somit ungeschützt vor einem Abbau durch Nukleasen. Daher wird der Chelatbildner Chelex direkt zur Probe gegeben, um mehrwertige Kationen (z.B. Mg^{2+} -Ionen) zu binden, die DNA-abbauende Enzyme für ihre Funktionstüchtigkeit benötigen. Dies ist eine sehr schnelle und kostengünstige Methode zur DNA-Extraktion und ist in der Rechtsmedizin recht verbreitet. Ein Vorteil dieser Methodik ist, dass die Gefahr der Kontamination

einer Probe gesenkt wird, da die Durchführung nur wenige Schritte umfasst und alle Ablaufschritte in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden.

Die Chelex-Extraktion ist vor allem bei rezentem Spurenmaterial geeignet. Zur Extraktion von älterem Spurenmaterial kommen vorrangig andere Extraktionsmethoden zum Einsatz, da diese Art der Extraktion nicht sehr schonend für das DNA-Material ist und dadurch eventuell empfindliches und länger gelagertes biologisches Untersuchungsmaterial für weitere Analysen komplett unbrauchbar gemacht werden könnte [URL-2].

1.4.2 Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Aufreinigung (PCI)

Die PCI-Methodik basiert auf der Nutzung von organischen Chemikalien zur Aufreinigung der DNA und ist ein sensitives, effizientes Verfahren. Diese Extraktionsmethode findet oft bei biologischem Spurenmaterial Einsatz, bei dem die DNA durch verschiedenste Umwelteinflüsse (z.B. UV-Strahlung, chemische Reagenzien, etc.) bereits verändert oder degradiert vorliegt, oder aber auch nur geringe Mengen an zu untersuchendem Material vorhanden sind. Hierbei sorgen die eingesetzten Chemikalien (Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol) dafür, dass sich Proteine und Nukleinsäuren voneinander trennen. Des Weiteren sind sie dafür verantwortlich, dass weitere probenabhängige Störfaktoren, die die DNA negativ beeinflussen können, entfernt werden.

Grundlegend beruht die PCI-Methodik auf der Phasentrennung eines heterogenen Gemisches durch die Zugabe von Phenol und Chloroform. Lipophile Stoffe reichern sich in der unteren Phase an, störende Proteine werden denaturiert und lagern sich dann in der Interphase des Gemisches an. In der wässrigen, obersten Phase befindet sich die DNA.

Durch die Zugabe von Phenol zur lysierten Probe und anschließender Zentrifugation kommt es zur Phasentrennung der wässrigen Phase mit DNA von der Interphase mit Proteinen und der lipophilen Phase. Mit der Zugabe von Chloroform werden Phenol und lipophile Stoffe aus dem Gemisch entfernt. Das Isoamylalkohol im Chloroform verhindert ein Aufschäumen der organischen Phase.

Die durch die PCI-Methodik erhaltenen DNA-Ausbeuten sind relativ hoch und von guter Qualität. Im Gegensatz zu der oben genannten Chelex-Extraktion, ist dies ein für das biologische Material schonendes Verfahren, jedoch aufgrund mehrfacher Reaktionsgefäßwechsel auch kontaminationsanfälliger. Darüber hinaus ist die PCI eine sehr zeitaufwändige Methode und bedarf aufgrund der Verwendung von toxischen Substanzen die Einhaltung von Vorsichtsmaßnahmen [URL-2].

1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Mit einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können im Allgemeinen bereits geringste Mengen an DNA vervielfältigt werden. Dies ist ein enzymatischer, mit dem Thermocycler realisierter Prozess. Hierbei kommt es zu einer Anlagerung eines Primers an einer Template-DNA und anschließend zu einer Kettenverlängerung des Stranges, sodass am Ende des Vorgangs eine komplementäre Kopie des Template-Stranges vorliegt. Dieser Ablauf wird zyklisch wiederholt, wodurch in kürzester Zeit die bisher für eine Analyse zur Verfügung stehende Menge an DNA deutlich vervielfacht.

1.5.1 Einzelbasenverlängerung (SNaPshot-PCR)

Die Single-Base-Extension (SBE), auch Minisequenzierung genannt, beruht prinzipiell auf der Verlängerung der Primer um ein Nukleotid. Diese Methodik wird mithilfe von Enzymen und sich thermozyklisch wiederholenden Reaktionen umgesetzt. Bei der Einzelbasenverlängerung bindet der eingesetzte Analyse-Primer an die einzelsträngige DNA-Sequenz und endet dabei eine Position (Nukleotid) vor der zu untersuchenden SNP-Position (Abbildung 2). Diese Primer besitzen zur besseren Unterscheidung im Multiplex-Ansatz oftmals einen unspezifischen Überhang am 5'-Ende. Im Anschluss an die Primeranlagerung kommt es zum Einbau eines, zur polymorphen Region, komplementären Didesoxynukleotids (ddNTP) am 3'-Ende des Primers durch eine DNA-Polymerase. Da aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe des fluoreszenzmarkierten ddNTPs keine weitere Strangsynthese möglich ist, erfolgt nach dem gelungenen Einbau des Nukleotids ein Kettenabbruch. Damit die spätere Detektion und Unterscheidung der zu analysierenden Nukleotide Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C) möglich ist, sind diese mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Am Ende der Reaktion liegen unterschiedlich lange und markierte Fragmente vor. Im letzten Schritt können diese Fragmente der Länge nach aufgetrennt werden. Ein Nachweis der farbmarkierten Oligonukleotide kann mittels verschiedener Verfahren, wie z.B. Microarray-Technologien oder auch Kapillarelektrophorese realisiert werden, sodass man ein SNP-Profil erstellen kann.

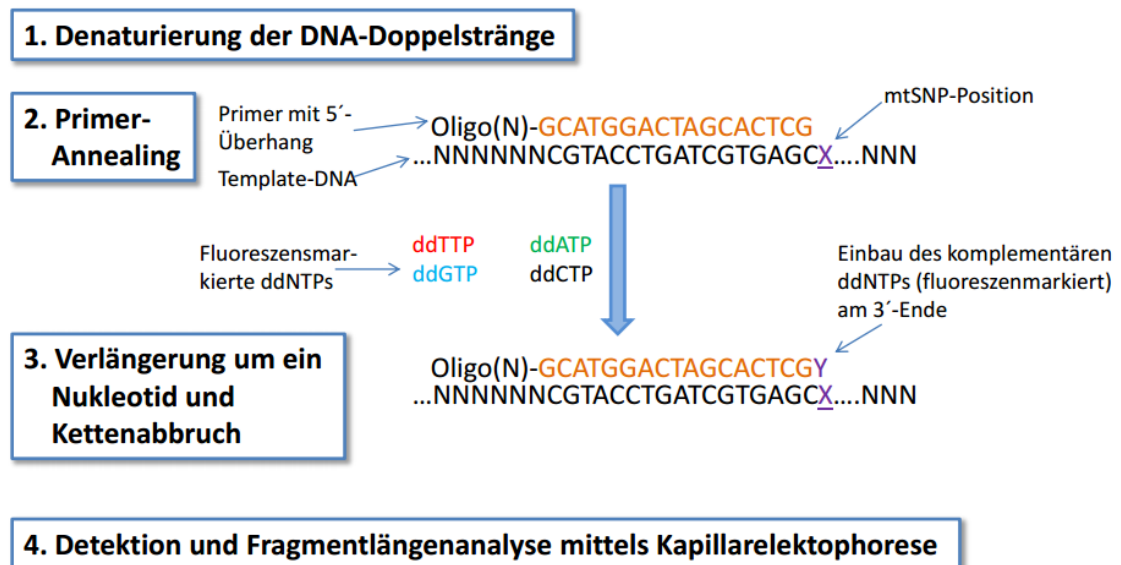


Abbildung 2: Ablauf Einzelbasenverlängerung (SNaPshot-Methode)

Die Abbildung zeigt den schrittweisen Ablauf einer Minisequenzierung. Nach der Denaturierung des DNA-Doppelstranges erfolgt die Anlagerung eines spezifischen Primers an der einzelsträngigen Template-DNA. Alle Primer wurden dabei durch einen unspezifischen Überhang am 5'-Ende verlängert. Nach dem Primerannealing wird komplementär zu der zu analysierenden Position (X) mittels einer DNA-Polymerase am 3'-Ende des angelagerten Primers ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP (Y) angebaut. Anschließend folgt aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe am ddNTP ein Kettenabbruch. Der Nachweis der markierten Oligonukleotide sowie eine Auftrennung entsprechend der Fragmentlängen wird mithilfe der Kapillarelektrophorese durchgeführt.

Ein Vorteil dieser Sequenziermethode zur SNP-Analyse ist, dass die Analysen im Multiplex-Ansatz durchgeführt werden können. Es werden im Gegensatz zu anderen Verfahren Kosten und Zeit gespart. Weiterhin werden bei diesem Vorgang nur kleine Fragmente amplifiziert, was unter anderem bei länger gelagertem biologischem Untersuchungsmaterial von Vorteil ist.

1.6 Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (KE) ist eine Methode um molekulare Marker, wie SNPs oder STRs zu detektieren. Die Detektion und Unterscheidung der speziellen Marker erfolgt auf Basis der Laufzeit von unterschiedlich langen Oligonukleotid-Fragmenten. Sie ist eine weit verbreitete und im Gegensatz zu MALDI-TOF MS und Arrayed Primer Extension (APEX) einfache Detektionsmöglichkeit in der molekularen Genetik. Weiterhin wird mithilfe der Kapillarelektrophorese aufgrund automatisierter Abläufe die Reproduzierbarkeit erhöht und die Analysezeit für jede Probe deutlich gesenkt.

Die KE ist ein analytisches Trennverfahren und beruht prinzipiell auf der Auftrennung von unterschiedlich langen DNA-Fragmenten in einem Polymer, sowie der Detektion fluoreszenzmarkierter, einzelsträngiger DNA-Fragmente mittels Lasertechnik.

Ein Kapillarelektrophoresegerät ist generell aus folgenden Elementen zusammengesetzt: zwei Puffergefäßen, zwei Elektroden, die über eine Hochspannungsstromversorgung miteinander verbunden sind und einer feinen, mit einem Polymergel gefüllten Glaskapillare (Abbildung 3). Darüber hinaus gehören noch ein Fluoreszenzdetektor, eine Anregungsquelle des Lasers und ein Autosampler zu einer vollständigen KE-Vorrichtung. Mithilfe eines Computers werden die Probeninjektion, sowie die Detektion gesteuert. Üblicherweise werden für die Auftrennung von DNA-Fragmenten Glaskapillaren mit einem Durchmesser von 50 µm genutzt. Die Kapillarelektrophoreseeinheiten der Firma Applied Biosystems sind vorwiegend mit einer „Injektions-Detektions-Distanz“ von 36 cm oder 50 cm versehen [Butler, 2011].

Bei dieser Form der Elektrophorese dient im Gegensatz zu anderen Verfahren ein viskoses Polymer als „Sieb“ zur Molekülauftrennung. Dabei bewegen sich die in wässriger Lösung negativ geladenen DNA-Fragmente im Gel (Polymer) unter Einfluss eines elektrischen Feldes zur positiv geladenen Anode [URL-3]. Die Polymerketten des Gels wirken dabei wie ein Netz, durch welches sich die unterschiedlich langen DNA-Moleküle bewegen müssen. Ein häufig genutztes Verfahren zur Probeninjektion ist die elektrokinetische Injektion, bei der an ein Ende der Kapillare eine definierte Spannung angelegt wird. Durch diese Spannung wird ein bestimmtes Probevolumen angesaugt und die Kapillare im Anschluss vom Probengefäß wieder in ein Elektrolytgefäß (Puffer) überführt. Danach wird die Elektrophoresespannung angelegt. Durch das unterschiedlich schnelle Migrationsverhalten der Moleküle im Gel wird eine längenbasierte Auftrennung der DNA-Fragmente bewirkt. Dabei gilt, dass sich kürzere, beweglichere Fragmente schneller durch das Polymer der Kapillare bewegen, als längere, größere Moleküle. Mithilfe dieses Verhaltens wird die exakte Unterscheidung der Allele ermöglicht. Die Kapillare führt durch einen mit einem Laser versehenen Detektor. Es wird die automatische Detektion der Fragmente durch das KE-Gerät realisiert, indem die Zeitspanne zwischen Probeninjektion und Probendetektion gemessen wird. An einer bestimmten Position wird die Kapillare mit einem Laser durchstrahlt und die DNA-Fragmente durch dieses Fenster detektiert. Wobei in Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente die kleineren Moleküle schneller am Detektionsfenster vorbei gelangen als größere DNA-Moleküle. Es besteht eine Korrelation zwischen der Migrationsgeschwindigkeit und der Länge bzw. Nukleotidanzahl der jeweiligen DNA-Fragmente.

Mit einer Software wird aus den Rohdaten unter Berücksichtigung des bekannten Größenstandards für jede Probe ein Elektropherogramm erstellt. In diesem werden die relative Fluoreszenz (RFU) und Moleküllänge gegeneinander aufgetragen. Man kann

das Fluoreszenzemissionssignal im Zusammenhang mit den gemessenen DNA-Fragmenten nutzen, um ein Quantifizieren der detektierten DNA-Fragmente zu ermöglichen. Bei diesem Verfahren können folgende Faktoren Einfluss auf die Auftrennung der Moleküle haben: die Kapillare, die Spannung, das für die Auftrennung verwendete Polymer-Gel und die Elektrophorese-Puffer [Butler, 2011].

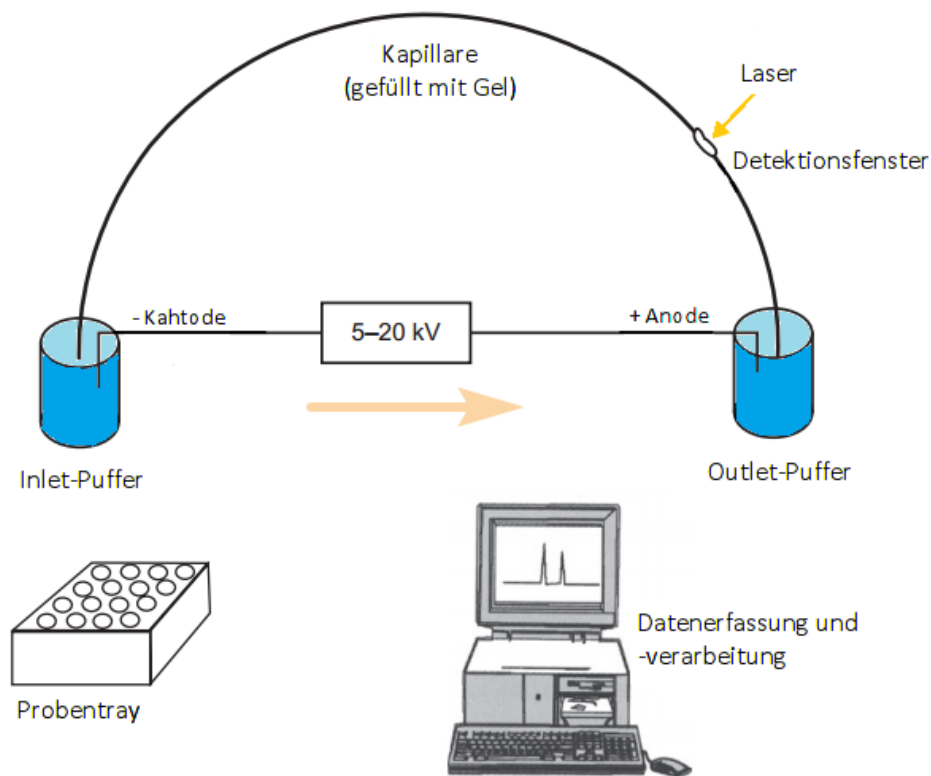


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Kapillarelektrophorese [Pflugbeil, 2012]

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer Messvorrichtung zur Detektion von DNA-Fragmenten mithilfe einer Kapillarelektrophorese. Die zu analysierenden Proben mit den farbstoffmarkierten DNA-Fragmenten werden in einem Probenständer (Probentray) platziert. Eine feine Glaskapillare ist mit einem Polymer-Gel gefüllt, welches das Wanderungsverhalten der unterschiedlich langen DNA-Fragmente und somit auch ihre Auftrennung beeinflusst. Die zwei Puffergefäße (Inlet- und Outlet-Puffergefäß) sind über diese Kapillare miteinander verbunden. Eine Probe wird durch eine angelegte Spannung in die Kapillare aufgenommen und diese fährt wieder zurück in ein Puffergefäß. Nach dem Anlegen einer Spannung bewegen sich die DNA-Moleküle, in Abhängigkeit ihrer Größe, unterschiedlich schnell im Polymer. Durch ein Detektionsfenster am Ende der Kapillare können mittels eines Laserstrahls die fluoreszenzmarkierten Fragmente detektiert werden. Die erhaltenen Signale werden direkt mithilfe einer speziellen Analysesoftware ausgewertet und können in Form eines Elektropherogramms dargestellt werden.

2 Zielstellung

Im Zuge von Forschungsabsichten wurden im Jahr 2004 Speichelproben von Teilen der Bevölkerungsgruppen aus Ghana (Ewe) und Äthiopien (Amharen) genommen. Mit den aus den Speichelproben angefertigten DNA-Isolaten, wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt autosomale STR- und zum Teil Y-STR Analysen durchgeführt. Die Erkenntnisse der vergangenen STR-Analysen sollen nun durch Absichten einer populationsgenetischen Studie anhand von mtDNA-Analysen an einem umfangreichen Probenet durchgeführt werden. Als zu untersuchende molekulare Marker dienen *mitochondriale Single nucleotide Polymorphisms* (mtSNPs).

Ziel der Arbeit ist es die DNA-Isolate aus genannten Speichelproben bezüglich einer Gruppe von mtSNPs zu untersuchen. Das mtSNP-System, sowie die Durchführung basieren auf Teilinformationen der Veröffentlichung von *Paneto et al.* aus dem Jahr 2011. Dabei werden zunächst alle Loci in einer Multiplex-PCR und anschließend in einer *Single base extension*-Reaktion, basierend auf dem Prinzip eines SNaPshot-Assays, amplifiziert. Ein enormer Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass eine Gruppe von Loci in einem Ansatz amplifiziert werden kann. Die Auswertung der mtSNP-Profile erfolgt anhand des bereits publizierten Multiplexsystems zur Haplogruppenklassifikation [Paneto et al., 2011].

3 Material

3.1 Geräte und Software

Das folgende Kapitel umfasst alle die für die vorliegende Arbeit verwendeten Geräte und Software.

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Gerätebezeichnung	Firma
Thermocycler	GeneAmp®PCR System 9700	Applied Biosystems
Thermoblock	TRIO-Thermoblock	biometra
Vortex	lab dancer	vario
Sequenziergerät	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
UV-Schrank	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR	Kisker
UV-Lampe	TA 150	Solimed-Quarzlampen
Pipetten	2,5 µl, 10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	eppendorf

Tabelle 2: Gerätesoftware

Software	Firma
Data Collection Software ABI 310	Applied Biosystems
Genemapper® ID Software Version 2.0 (Analysesoftware ABI 310)	Applied Biosystems

3.2 Verbrauchsmaterialien

In diesem Abschnitt werden alle genutzten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Firma
Pipettenspitzen (Dualfilter)	0,1 - 10 µl, 100 µl, 1000 µl	eppendorf
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips	Sarstedt
Reaktionsgefäße	0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml	eppendorf

3.3 Verbrauchslösungen

Für die optimale Durchführung der Analysen sind hier die benötigten Chemikalien, Enzyme und Verbrauchslösungen aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalien zur gDNA- und mtSNP-Analyse

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
PowerPlex® S5 System		Promega
Aqua dest.	Ampifikationswasser	Promega
Oligonukleotide	PCR, SNaPshot-Primer	BioTeZ Berlin-Buch GmbH
Multiplex-PCR-Kit		QIAGEN
SNaPshot® Multiplexkit		Applied Biosystems
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP 1 un/µl	usb®
Exonuklease I	EXO I 10 un/µl	usb®
Genescan™ 120 LIZ™	Size Standard	Applied Biosystems
Hi-Di™ Formamid		Applied Biosystems

3.4 Primer

Die Sequenzen und Primerlängen wurden aus Literaturstellen entnommen [Paneto et al., 2011]. Alle eingesetzten Primer für die DNA-Amplifikation in der Multiplex-PCR und der folgenden SNaPshot-PCR wurden von der Firma Biotez geliefert.

3.4.1 Mutlplex-PCR-Primer

Für diese Arbeit wurden die Multiplex-Primer aus einer Publikation mit einem 42-mtSNP-System entnommen, welches mit dieser und weiteren fortführenden Studien neu etabliert werden soll [Paneto et al., 2011].

Die Primer für das Multiplex-Verfahren hatten eine Ausgangskonzentration von 50 μ M. Diese Konzentration wurde zu Beginn der Analysen anhand von Vorversuchen neu eingestellt.

Die Tabelle 19 im Anhang umfasst alle Primersequenzen (Forward und Reverse) des in der Publikation von *Paneto et al.* vorgestellten mtSNP-Systems. In dieser werden außerdem Angaben zur Amplikongröße und Sequenzabfolge gemacht. Die in der Tabelle farblich hervorgehobenen Primer sind für diese Studie vor allem von Interesse. Mithilfe dieser Primer ist es möglich die für die vorliegende Arbeit ausgewählten Haplogruppen spezifischen mtSNP-Positionen zu analysieren.

Weiterhin wurden Multiplex-Primer aus Systemen von zwei weiteren Publikationen [Brandstätter et al., 2003; Vallone et al., 2004] genutzt. Diese Primer wurden im Zuge einer anderen Arbeit bereits ausgetestet und die Sequenzen aus der Arbeit entnommen [Pflugbeil, 2012]. Die Primer wurden ausschließlich zum Testen der DNA Qualität und Quantität der zur Verfügung stehenden Proben verwendet.

3.4.2 SNaPShot-PCR-Primer

In der Abbildung 12 (siehe Anhang) sind tabellarisch alle Primer, die für die SNaPshot-PCR benötigt wurden aufgelistet. Hier sind Angaben zur Primerbezeichnung, der Sequenz und der Länge dargestellt. Weiterhin ist die Orientierung der Primer in Reverse- bzw. Forward-Richtung angegeben. Die speziell für die vorliegende Arbeit verwendeten Primer zur Untersuchung der gewünschten mitochondrialen Positionen wurden in der Tabelle markiert.

Für die Testung der gDNA und mtDNA Qualität und Quantität wurde ebenfalls auf die SBE-Primersequenzen aus den Publikationen von [Vallone, 2004 & Brandstätter, 2003] zurückgegriffen die in einer vorhergehenden Studie [Pflugbeil, 2012] getestet wurden.

3.5 Untersuchungsmaterial

Das verwendete biologische Untersuchungsmaterial stammt aus den zwei afrikanischen Ländern Ghana (Ewe) und Äthiopien (Amharen). Dabei wurden rund 200 Proben von Einwohnern aus Ghana und ca. 380 Proben von Bewohnern aus Äthiopien entnommen. Die Proben lagen in Form von Wangenschleimhautabstrichen vor. Diese wurden im Jahr 2004 mittels in der Forensik üblichen Wattetupfern gesichert. Die DNA-Isolate für alle Speichelproben waren bereits verfügbar. Durch die DNA-Isolation mittels Chelex-Extraktionstechnik und einer Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol DNA-Aufreinigungsmethodik wurde ein umfangreiches DNA-Probenset erzeugt und aufbewahrt. Des Weiteren lagen zum Zeitpunkt bereits Ergebnisse aus autosomalen STR- und zum Teil Y-STR Analysen vor. Anhand derer wurden ein Probenset mit je 50 Proben von Ghana und Äthiopien zusammen gestellt, welche in dieser Arbeit analysiert wurden.

4 Methoden

4.1 Bestandsaufnahmen

Im Vorfeld der Analysen wurde eine Bestandsaufnahme des Untersuchungsmaterials durchgeführt. Dabei sollten pro Individuum zwei Wattetupfer vorhanden sein. Weiterhin wurden im Vorfeld bereits für alle Speichelproben DNA isoliert.

Zunächst wurde eine Bestandsaufnahme der Speichelproben und der entsprechenden Isolate durchgeführt. Dafür wurden die Proben nach verschiedenen Aspekten katalogisiert. Für eventuelle spätere DNA-Nachisolationen wurde überprüft und in Form einer Tabelle festgehalten, welche Menge der jeweiligen vorhandenen Speichelproben noch zur Verfügung steht. Darüber hinaus wurde kontrolliert, ob für die beabsichtigten Analysen von jeder Speichelprobe ein DNA-Isolat existiert. Dafür wurde Volumen an DNA-Isolat und die Art der Isolation notiert.

4.2 DNA-Qualitätstests und Primeranalyse

4.2.1 gDNA-Untersuchung mittels S5-Powerplex-Analyse

Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, war es für die beabsichtigten Analysen zunächst wichtig zu überprüfen, ob sich die DNA der seit 2004 gelagerten Isolate quantitativ und qualitativ bereits verändert hat. Hierfür wurden Analysen auf Grundlage der gDNA und der mtDNA (Kapitel 4.2.2) durchgeführt.

An ausgewählten Isolaten wurde die gDNA-Qualität mit bereits in anderen Projekten verwendeten STR-Marker-Testsystemen untersucht [Pflugbeil, 2012]. Für diese Absichten wurde das PowerPlex®S5-Kit (mini-Multiplex-STR-Kit) der Firma Promega verwendet. Dieses mini-Multiplex-STR-Kit erlaubt den Nachweis von vier STR-Markern (D18S51, TH01, D8S1179, FGA) und dem geschlechtsspezifischen Marker Amelogenin.

Die Rahmenbedingungen für den Reaktionsansatz und das Amplifikationsprotokoll wurden von einer vorhergehenden Arbeit übernommen [Pflugbeil, 2012].

Der Ansatz für die Amplifikation erfolgte mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl. Dafür wurde für je eine Probe ein Mastermix aus 5 µl PowerPlex® S5 MasterMix und 2,5 µl PowerPlex® S5 10xPrimer Pair Mix erstellt (Tabelle 5). Dann wurde die DNA hinzugefügt und das Reaktionsgemisch mit Amplifikationswasser bis zu dem Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Tabelle 5: Präamplifikationsansatz PowerPlex®S5-Kit [Pflugbeil, 2012]

Komponente des Reaktionsansatzes	Volumen/Reaktion
Wasser (Amplifikationsgrad)	auf das Reaktionsvolumen von 25 µl anpassen
PowerPlex® S5 MasterMix (5x)	5,0 µl
PowerPlex® S5 Primer Pair Mix (10x)	2,5 µl
Template-DNA	2 bis 17,5 µl
	Reaktionsvolumen 25 µl

Das Reaktionsgemisch wurde im Thermocycler platziert und die Amplifikation nach Standardbedingungen (Tabelle 6) gestartet.

Tabelle 6: Amplifikationsprotokoll PowerPlex® S5-Kit [Pflugbeil, 2012]

Amplifikationsprotokoll

96 °C für 2 min

94 °C für 30 sec

60 °C für 2 min

72 °C für 90 sec

für 30 Zyklen

60 °C für 45 min; 4 °C abkühlen

Nach dem Beenden der PCR und dem Abkühlen der Proben auf 4 °C wurden diese bei -20 °C gelagert.

Die Detektion der Fragmente erfolgte mit dem Sequenzer ABI PRISM™ 310 und die Auswertung der Ergebnisse mit der GeneMapper-Software.

4.2.2 mtDNA-Voranalysen mittels verschiedener SNP-Systeme

Die Qualität der mtDNA wurde mit drei mtSNP-Systemen geprüft, die bereits in einer vorherigen Studie ausgetestet und etabliert wurden. Die Reaktionsbedingungen und das Amplifikationsprotokoll für die Multiplex-PCR und der SNaPshot-Minisequenzierung wurden daraus übernommen [Pflugbeil, 2012].

Alle drei mtSNP-Systeme umfassten ein Set von jeweils acht zu analysierenden mtSNPs. Im ersten Schritt wurde eine Multiplex-PCR und anschließend eine SBE-Reaktion durchgeführt.

Die Amplifikation der Marker erfolgte mit dem QIAGEN Multiplex PCR Kit im Multiplexverfahren. Alle drei Ansätze im Multiplexverfahren wiesen ein Reaktionsvolumen von 13 µl auf (Tabelle 7).

Tabelle 7: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012]

Die Angaben wurden auf jedes der drei 8-plex-Systeme angewendet. Das eingesetzte Volumen an DNA betrug in diesem Fall immer 3 µl.

Komponente des Reaktionsansatzes	Volumen/Reaktion
Multiplex-PCR-Mastermix	6,25 µl
Primer	je 0,2 µl
Aqua dest.	auf das Reaktionsvolumen von 13 µl anpassen
mtDNA	max. 3,55 µl

Die Amplifikationen wurden im Thermocycler nach dem entsprechenden Protokoll (Tabelle 8) durchgeführt.

Tabelle 8: Amplifikationsbedingungen Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012]

Amplifikationsprotokoll

95 °C für 15 min – Initiale Denaturierung

94 °C für 30 sec – Denaturierung

64 °C für 50 sec – Primerannealing

72 °C für 40 sec – Extension

für 30 Zyklen

60 °C für 20 min – Finale Extension

8°C abkühlen

Nach dem ersten PCR-Schritt erfolgte die enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte mittels EXO I und SAP.

Die SBE-Reaktion im Anschluss wurde mit dem SNaPshot-PCR Multiplex-Kit durchgeführt. Das Reaktionsvolumen für jeden Ansatz umfasste 10 µl (Tabelle 9).

Tabelle 9: Reaktionsansatz SNaPshot-PCR [Pflugbeil, 2012]

Die Angaben zur Herstellung des Reaktionsansatzes wurden auf alle drei 8-plex-Systeme angewendet. Das eingesetzte Volumen an Multiplex-PCR-Produkt belief sich auf 0,5 µl pro Probe.

Komponente	Volumen/ Reaktion
SNaPshot Multiplex Mix	3 µl
Primer	je 0,4 µl
Aqua dest.	auf das Reaktionsvolumen von 10 µl anpassen
Multiplex-PCR-Produkt	0,5 µl – 1 µl

Die Amplifikationsbedingungen wurden unverändert aus der Studie [Pflugbeil, 2012] entnommen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Amplifikationsbedingungen der Einzelbasenverlängerung [Pflugbeil, 2012]

Amplifikationsprotokoll
96 °C für 10 sec
50 °C für 5sec
60 °C für 30 sec
für 25 Zyklen auf 4 °C abkühlen

Im Anschluss an diesen PCR-Schritt erfolgte die Behandlung der Proben mit dem Enzym SAP. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert. Die kapillarelektrophoretische Auswertung wurde auf dem Sequenziergerät ABI PRISM™ 310 mithilfe der Software GeneMapper durchgeführt.

4.2.3 Primeranalyse (Paneto et al.)

Die 42 neu gelieferten Primer wurden zunächst auf ihre allelspezifischen Signale und Funktionalität getestet. Dabei wurde geprüft, ob alle Loci korrekt amplifiziert werden und Primer an den entsprechenden Stellen der mtDNA binden. Die Amplifikationen im Multiplexverfahren wurden mithilfe des QIAGEN Multiplex PCR Kits realisiert und die Einzelbasenverlängerung mit dem SNaPshot-PCR Multiplex-Kit.

Alle Ansätze wurden nach demselben Muster durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgte eine Multiplex-PCR mit den jeweiligen Forward- und Reverse-Primern für jeden mtSNP-Locus. Daran angeschlossen fand ein enzymatischer Verdau mit den Enzymen EXO I und SAP statt. Im Zweiten Schritt wurde eine SNaPshot-PCR, oder auch SBE-PCR, mit den entsprechenden SBE-Primern durchgeführt. Nach diesem Schritt wurde ein weiterer Verdau mit dem Enzym SAP durchgeführt.

Die Reaktionsbedingungen und das Amplifikationsprotokoll wurden aus einer vorhergehenden Arbeit zur Etablierung von mtSNP-Systemen übernommen [Pflugbeil, 2012]. Für die Multiplex-PCR können die Reaktionsbedingungen aus Tabelle 7 und die Amplifikationsbedingungen aus Tabelle 8 entnommen werden. Die Bedingungen für die Einzelbasenverlängerung nach der SNaPshot-Methodik sind den Tabellen 9 und 10 zu entnehmen.

Im Laufe der Analysen wurde das Amplifikationsprotokoll für die Multiplex-PCR an die der Literaturstelle [Paneto et al., 2011] angepasst (Tabelle 11).

Tabelle 11: Multiplex-PCR-Amplifikationsprotokoll [nach Paneto et al., 2011]

Amplifikationsprotokoll
95 °C für 10 min
95 °C für 30 sec
55 °C für 45 sec
72 °C für 3 sec
→ für 3 Zyklen
95 °C für 30 sec
55 °C für 45 sec
(mit steigender Temperatur pro Zyklus um 0,2 °C)
72 °C für 30 sec
→ für 19 Zyklen
95 °C für 30 sec
60 °C für 45 sec
72 °C für 30 sec
→ für 11 Zyklen
72 °C für 7 min auf 4 °C abkühlen

Die Multiplex- und SBE-Primer wurden innerhalb dieser Analysen auch auf mögliche Selbsthybridisierungen, Crosshybridisierungen und der Ausbildung anderer Sekundärstrukturen wie zum Beispiel Primer-Dimer-Strukturen getestet. Die Untersuchung der Sequenzen erfolgte mit der Software AutoDimer [URL-4].

4.3 mtSNP-Analyse (Paneto et al.)

Die Analyse bezieht sich lediglich auf ausgewählte mtSNP-Positionen, die im weiteren Verlauf untersucht werden. Es wurden lediglich acht der 42 Positionen verwendet, da diese den afrikanischen Zweig des in der Publikation zugrunde liegenden Haplogruppenbaums widerspiegeln.

Im ersten Schritt werden die DNA-Proben mit sequenzspezifischen Primer amplifiziert. Im Anschluss daran findet die SBE-Reaktion (Einzelbasenverlängerung) statt. Bei der Anlagerung des einzelnen fluoreszenzmarkierten Nukleotids kommt es zur Amplifikation unterschiedlich langer Fragmente. Im Anschluss kann durch diese Farbmarkierung und der Entstehung der unterschiedlich langen Fragmente mittels

Kapillarelektrophorese die Unterscheidung der ausgewählten mtSNP-Positionen erfolgen. Die Abbildung 4 fasst schematisch alle Schritte der mtSNP-Analyse zusammen.

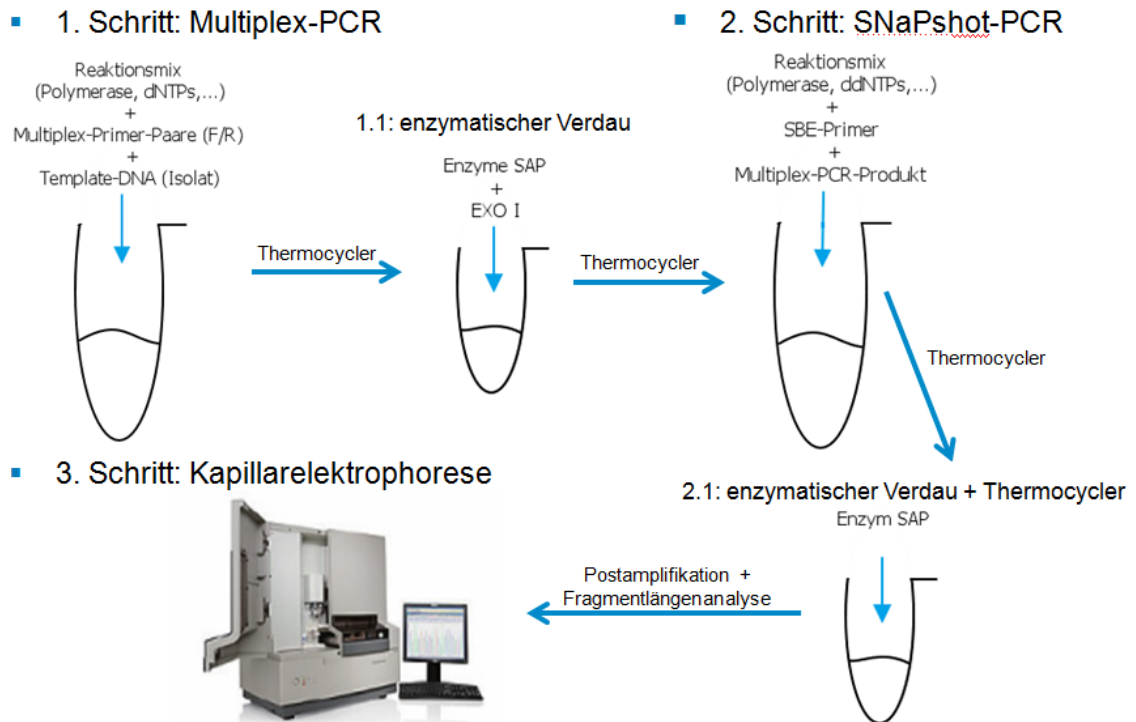


Abbildung 4: schematischer Ablauf der mtSNP-Analyse

In der vorliegenden Abbildung wird das Vorgehen der mtSNP-Analyse zusammengefasst. Im ersten Schritt erfolgt die Amplifikation der Template DNA in einem Multiplex-PCR-Ansatz. Im Anschluss daran werden die erhaltenen PCR-Produkte mit den Enzymen EXO I und SAP aufgereinigt. SAP baut dabei die nicht verwendeten dNTPs ab und EXO I die restlichen, noch im Reaktionsansatz vorhandenen Primer aus dem ersten Schritt. Dem enzymatischen Verdau folgt die SNaPshot-PCR zur Einzelbasenverlängerung. Nach diesem PCR-Schritt findet wieder ein Abbau der nicht verwendeten ddNTPs durch das Enzym SAP statt. Vor der kapillarelektrophoretischen Analyse findet eine Postamplifikation statt, indem die PCR-Produkte mit einem Größenstandard und Formamid vorbereitet werden.

4.3.1 Multiplex-PCR ausgewählter mtSNP-Positionen

Für die Durchführung der Multiplex-PCR wurde das QIAGEN Multiplex PCR Kit genutzt. Die Reaktionsbedingungen der Multiplex-PCR wurden unverändert von [Pflugbeil, 2012] übernommen.

Für den PCR-Schritt wurde ein Reaktionsvolumen von 13 µl für jeden Ansatz verwendet (Tabelle 12). Es wurde ein Reaktionsgemisch aus 6,25 µl Multiplex-PCR-Mastermix und je 0,2 µl der entsprechenden Primer (Forward und Reverse) angefertigt. Hinzu kamen 3

µl des jeweiligen DNA-Isolates sowie Aqua dest. zum Auffüllen der Probe bis zu einem Reaktionsvolumen von 13 µl.

Tabelle 12: Reaktionsansatz der Multiplex-PCR [Pflugbeil, 2012]

Die Volumenangaben wurden auf alle durchgeführten Analysen angewendet.

Komponente des Reaktionsansatzes	Volumen/Reaktion
Multiplex-PCR-Mastermix	6,25 µl
Primer	je 0,2 µl
Aqua dest.	auf das Reaktionsvolumen von 13 µl anpassen
mtDNA-template	3 µl

Das Amplifikationsprotokoll (Tabelle 13) wurde unverändert aus der Literaturstelle angewandt [Paneto et al., 2012]

Tabelle 13: Amplifikationsbedingungen der Multiplex-PCR

Amplifikationsprotokoll

95 °C für 10 min – Initiale Denaturierung

95 °C für 30 sec – Denaturierung

55 °C für 45 sec – Primerannealing

72 °C für 3 sec - Extension

→ für 3 Zyklen

95 °C für 30 sec - Denaturierung

55 °C für 45 sec – Primerannealing

(mit steigender Temperatur pro Zyklus um 0,2 °C)

72 °C für 30 sec - Extension

→ für 19 Zyklen

95 °C für 30 sec - Denaturierung

60 °C für 45 sec - Primerannealing

72 °C für 30 sec - Extension

→ für 11 Zyklen

72 °C für 7 min – Finale Extension

auf 4 °C abkühlen

4.3.2 Enzymatische Aufreinigung der Multiplex-PCR-Produkte

An die Amplifikation der Sequenzen wurde eine enzymatische Aufreinigung der Multiplex-PCR-Produkte mit den Enzymen SAP und EXO I angehängen. Die Enzyme entfernen Faktoren, die in der darauffolgenden SNaPshot-PCR stören würden. Für den enzymatischen Verdau wurde jedem Ansatz je 1 µl SAP und 0,4 µl EXO I zugegeben. Dabei sorgt das Enzym EXO I für die Spaltung der freien Primer und SAP bewirkt die Dephosphorylierung der ungebundenen dNTPs. Nach der Zugabe der Enzyme lief der Verdau für 1 Stunde bei 37 °C ab und im Anschluss wurden die Enzyme 15 Minuten bei 75 °C inaktiviert. Dafür wurde der Ansatz im Thermocycler (GeneAmp®PCR System 9700) inkubiert.

4.3.3 SNaPshot-PCR (SBE-Reaktion)

Die Minisequenzierung wurde mithilfe des SNaPshot® Multiplex Kits realisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Markierung der ddNTPs im Reaktionsmix mit Fluoreszenzfarbstoffen besitzen alle einen anderen Emissionsbereich und vereinfachen später die Analyse und Auswertung der einzelnen Peaks. Im Elektropherogramm weist jedes ddNTP eine andere Farbe auf, mit der die Peaks erscheinen (Tabelle 14).

Tabelle 14: farbliche Markierung der verwendeten ddNTPs

In dieser Tabelle sind ddNTPs mit ihren jeweiligen Farben, wie sie in den Elektropherogrammen vorkommen, aufgelistet.

ddNTP	Fluoreszenzfarbstoff (Signalfarbe)
C	dTAMRA TM (Schwarz)
T	dROX TM (Rot)
A	dR6G (Grün)
G	dR110 (Blau)

Das Reaktionsvolumen eines Ansatzes wurde auf 10 µl festgelegt. Dabei wurde immer ein Volumen von 0,5 µl Multiplex-PCR-Produkt aus dem ersten PCR Schritt verwendet. Die Volumina der Komponenten für den Reaktionsansatz wurden von [Pflugbeil, 2012] übernommen, sie weichen nur geringfügig von den Bedingungen der Literaturstelle ab [Paneto et al., 2012].

Zunächst wurde ein Reaktionsmix aus mit 3 µl SNaPshot Multiplex Mix und je 0,4 µl der entsprechenden SBE-Primer erstellt (Tabelle 15). Im Anschluss wurde 0,5 µl des Multiplex-PCR-Produktes hinzugefügt und das Reaktionsgemisch mit Aqua dest. bis zu dem Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt.

Tabelle 15: Reaktionsmix der SNaPshot-PCR [nach Pflugbeil, 2012]

Komponente	Volumen/ Reaktion
SNaPshot Multiplex Mix	3 µl
Primer	je 0,4 µl
Aqua dest.	auf das Reaktionsvolumen von 10 µl anpassen
Multiplex-PCR-Produkt	0,5 µl – 1 µl

Die Amplifikationsbedingungen (Tabelle 16) der SNaPshot-PCR wurden unverändert aus der Literaturstelle übernommen [Paneto et al., 2012].

Tabelle 16: Amplifikationsbedingungen der SNaPshot-PCR

Amplifikationsprotokoll
96 °C für 10 sec
55 °C für 5 sec
60 °C für 30 sec
→ für 25 Zyklen, auf 4 °C abkühlen

Im Anschluss an diesen PCR-Schritt wurden 1,25 µl des Enzyms SAP zu jedem Ansatz hinzugefügt, um ungebundene ddNTPs abzubauen. Der enzymatische Verdau erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C und die darauffolgende Inaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 15 Minuten. Der PCR-Schritt und der Verdau wurden mit dem GeneAmp® PCR System 9700 realisiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

4.3.4 Detektion mitochondrialer SNPs mittels Kapillarelektrophorese

Mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer wurde die Kapillarelektrophorese zur Analyse der Fragmentlängen und der Detektion der Fluoreszenzmarkierten Nukleotide durchgeführt. Dafür wurden die Proben im Vorfeld mit Formamid und Längenstandard vorbereitet (Tabelle 17). Es wurde ein Reaktionsgemisch aus 9 µl Formamid und 0,5 µl des Längenstandards erstellt. Zu diesem Mix wurden 0,5 µl des SNaPshot-PCR-Produktes hinzugegeben, sodass man ein Endvolumen von 10 µl erhält.

Tabelle 17: Vorbereitung der Proben für den Sequenzer (ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer)

Komponente	Volumen pro Reaktion
SNaPshot-PCR-Produkt	0,5 µl
Hi-Di™ Formamid	9 µl
Längenstandard (Genescan™ – 120 LIZ™)	0,5 µl
	Reaktionsvolumen 10 µl

Im Anschluss wurden die Proben zur Denaturierung für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert. Durch die Zugabe des Formamids wird gewährleistet, dass die Sequenzfragmente für die kapillarelektrophoretische Analyse dauerhaft einzelsträngig vorliegen. Die Bedingungen für die Analyse (Tabelle 18) mit Sequenzer wurden aus der wissenschaftlichen Arbeit [Pflugbeil, 2012] übernommen.

Tabelle 18: Parameter für den Lauf [Pflugbeil, 2012]

Parameter	Beschreibung
Modulfile	GS STR POP4 (1ml) E5.md5
Matrixfile	none
Injektionszeit (s)	5s
Injektion (kV)	15 sec
Lauf (kV)	15,0
Lauftemperatur	60 °C
Laufzeit	15 min

Mithilfe der Software GeneMapper® ID Software Version 2.0 wurde die Auswertung der Ergebnisse durchgeführt.

4.4 Haplogruppenklassifikation

Mitochondriale SNPs können als molekulare Marker dazu verwendet werden die menschliche Stammesgeschichte zu rekonstruieren. Aufgrund der sehr geringen Mutationsrate der SNPs werden konsistente Rückverfolgungen ermöglicht. Durch die Analyse der polymorphen Positionen besteht die Möglichkeit die mtGenome in Haplotypen einzuordnen. Bei Betrachtung der Gesamtheit der Haplotypen und ihren Ausprägungen, können diese einer bestimmten Haplogruppe zugeordnet werden. Über die Zeit haben sich verschiedene Haplogruppen entwickelt. Durch die Analyse der Mutationen von verschiedenen Generationen kann in etwa festgelegt werden wann sich eine neue Mutation gebildet und im mtGenom durchgesetzt hat und damit weiter vererbt wurde. Auf dieser Grundlage kann die Ausbildung und Verzweigung der Haplogruppen analysiert und Haplogruppenbäume konstruiert werden. Diese Informationen wurden in der Datenbank Phylotree verarbeitet und ein solcher Baum erstellt. In diesem werden alle Makrohaplogruppen und ihre weitere Einteilung in Subhaplogruppen dargestellt, sowie die polymorphen Regionen, die die jeweiligen Haplogruppen ausmachen, angegeben [URL-1]. Dabei können die Haplogruppen geographisch verschiedenen Regionen zugeordnet werden

In dieser Arbeit wurde der mtDNA-Haplogruppenbaum, Abbildung 5 von [Paneto et al., 2011] zur Haplogruppenklassifikation verwendet. Dieser Baum schlüsselt sich vom Ursprung (Start) in drei Hauptzweige auf. Dabei spiegelt die Abzweigung zur Haplogruppe M* die im asiatischen Raum vorkommenden Haplogruppen wieder. Die Abzweigung, welche zur Gruppe N* führt, beinhaltet die Haplogruppen des europäischen Raumes.

Innerhalb dieser Studie wurde allerdings nur ein Teil des Baumes, der zur Haplogruppe L3 (rote Markierung) führt und den afrikanischen Bereich widerspiegelt, verwendet. Es wurden ausschließlich diese acht mtSNP-Positionen für eine Haplogruppen-Einordnung genutzt. Dafür wurden anhand der Elektropherogramme die Ausprägungen der polymorphen Regionen analysiert und mithilfe des Baumes eingeordnet.

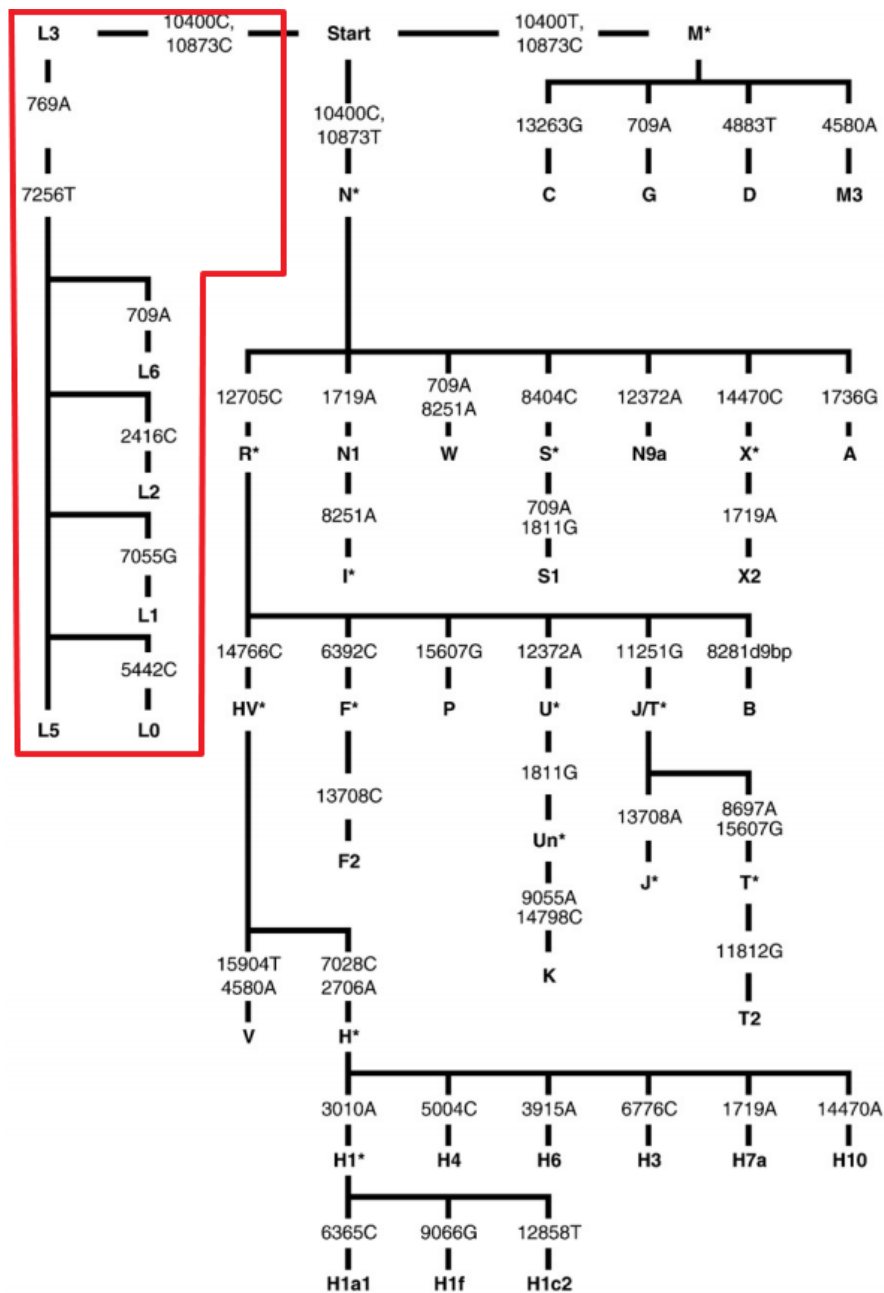


Abbildung 5: Haplogruppen (Hg) Klassifikationsbaum [Paneto et al., 2011]

Die vorliegende Abbildung stellt einen mtDNA-Haplogruppenbaum dar. Dieser dient der Einordnung zu einer Haplogruppe auf Basis von mitochondrialen SNPs. Der Baum verzweigt sich vom Startpunkt aus in drei Haupthaplogruppen (L3, M*, N*), die verschiedenen geographischen Regionen widerspiegeln. Von diesen drei Knotenpunkten spalten sich diverse Subhaplogruppen ab. Die Haplogruppe M* wird dabei dem asiatischen Bereich zugeschrieben und die Haplogruppe L3 dem afrikanischen Bereich. Der größte Zweig, hier ausgehend von N* repräsentiert die Gruppen, die Europa zugeordnet werden. Zu sehen sind die jeweiligen polymorphen Positionen und die Haplogruppen in die ihre Ausprägung führt.

5 Ergebnisse

5.1 Vorversuche und Fehleranalyse/Optimierung

5.1.1 Qualitätsuntersuchungen von gDNA und mtDNA

Bei Analysen mit genetischem Material muss mit der Degradation der gDNA sowie mtDNA gerechnet werden. Vor allem dann, wenn das DNA-Material bereits eine längere Lagerzeit aufweist. In diesem Fall wurden die Proben und Isolate aus Afrika seit 2004 aufbewahrt. Daher bestand ein Teil der Arbeit darin Qualitätsanalysen der DNA durchzuführen.

Mit dem PowerPlex®S5 Kit der Firma Promega wurden bei den ausgewählten Proben gute Ergebnisse für die Analyse der gDNA erzielt. Die Elektropherogramme der S5-Analyse zeigten eindeutige Verläufe für die STR-Marker. Dabei kam es zu keinen Allelausfällen oder dem Auftauchen unspezifischer Signale in den Profilverläufen.

Die Qualitätsanalysen für die mtDNA erfolgten für 24 Positionen aufgeteilt in drei 8-plex-Systemen. Dabei zeigten alle drei Systeme mit ihren Markern für alle eingesetzten Proben eindeutige Signalverläufe. Die erhaltenen Profile zeigten weder Allelausfälle noch unspezifische Signale. Es wurden gute Signalintensitäten erzielt und es war eine eindeutige Zuordnung der Signale möglich.

Die folgende Abbildung zeigt ein Elektropherogramm des mtSNP-Systems von [Vallone et al., 2004] mit eindeutigen Signalen für alle acht untersuchten Loci.

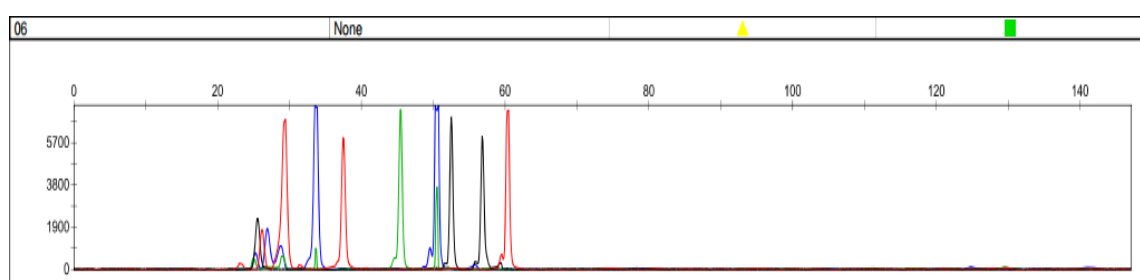


Abbildung 6: Elektropherogramm der mtDNA-Qualitätsuntersuchung [Vallone et al., 2004]

Zu erkennen ist das Elektropherogramm der Qualitätsuntersuchung der mtDNA mit dem mt-SNP-System von Vallone et al. für 8 Loci. Hierfür wurde ein DNA-Isolat aus Ghana verwendet. Dargestellt ist die Fragmentlängenanalyse in Kombination mit dem eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotid (vier Farbkanäle).

5.1.2 Testung der neuen Analyse-Primer im Singleplex- und Multiplexverfahren

Vor der Nutzung der Primer zur mtSNP-Analyse, wurde eine Funktionsanalyse der Oligonukleotide durchgeführt. Das Ziel der Untersuchung war die Überprüfung der Bindungsgenauigkeit der Primer und die damit verbundene exakte Amplifikation und Detektion der entsprechenden mtSNPs. Diese Untersuchungen wurden in Singleplex-, sowie Multiplex-Verfahren durchgeführt. Zur Bestimmung der geeigneten Primerkonzentration für die Multiplex- und SBE-PCR, wurden die Primerverdünnungen variiert. Dabei wurde mit den Verdünnungsstufen 1:10, 1:50 und unverdünnten Primern gearbeitet. Weiterhin wurden für die Analysen rezente DNA, alte DNA (aDNA) und DNA-Proben aus dem Afrika-Probenset verwendet. Bei der Ergebnisanalyse wurde auf folgende Schwerpunkte geachtet: Signalintensität, Signalspezifität, dem Auftreten unspezifischer Signale und Allelausfälle.

Die Marker wurden im ersten Schritt in der Multiplex-PCR amplifiziert und anschließend fand die Minisequenzierung statt. Im letzten Schritt konnten die mtSNPs mit der Kapillarelektrophorese detektiert werden und die Elektropherogramme mittels der GeneMapper ID Software 2.0 ausgewertet werden.

Zunächst wurden alle 24 mtSNPs in die Untersuchungen mit einbezogen. In der ersten Testung wurden die Primer in einer 1:10 Verdünnung angewendet. Die Analyse wurde mit aDNA und Afrika-DNA durchgeführt. Der Test der Multiplex-Primer im ersten PCR-Schritt erfolgte im Multiplexverfahren und die der SNaPshot-Primer im Singleplexverfahren. Die Evaluierung der daraus erhaltenen Ergebnisse war zunächst nicht eindeutig. Bei den Elektropherogrammen konnten die Signale nur schwer zugeordnet werden. Weiterhin waren in den Profilen oftmals keine allelspezifischen Signale erkennbar. Darüber hinaus traten unspezifische, zunächst nicht zuordenbare Signale auf. Dabei waren einige Signale auch komplementär zum erwarteten SNP. Auch die Leerkontrolle dieses Ansatzes war durch hohe Peaks gekennzeichnet, die mit den anderen Pherogrammen Übereinstimmungen zeigten. Daraufhin wurde mit den Primersequenzen eine Analyse mittels nBlast durchgeführt, um die Sequenz- und Strangspezifität zu überprüfen. Die daraus resultierenden Ergebnisse waren uneindeutig und zeigten keine Auffälligkeiten.

Es wurde eine zweite Leerkontrolle nach dem gleichen Schema erstellt, die das gleiche Ergebnis zeigte. Aufgrund dessen wurde auf Verunreinigungen hin geprüft und die Ausbildung von möglichen Sekundärstrukturen mit der Software AutoDimer analysiert. Dabei wurden keine Verunreinigungen ermittelt und der Test mit AutoDimer erbrachte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis. Es kommt zu keinerlei Hybridisierungen oder der Ausbildung anderer Sekundärstrukturen.

Daraufhin wurden sowohl die Multiplex-Primer als auch die SBE-Primer unverdünnt mit einer rezenten Speichelprobe getestet. Alle PCR-Schritte wurden im Singleplexverfahren realisiert. Die Amplifikationsbedingungen wurden denen aus der Publikation [Paneto et al., 2012] angepasst. Hier wurden gute Signalverläufe erzielt und die Peaks konnten den entsprechenden Loci zugeordnet werden. Jedoch waren die Pherogramme durch Farbdurchschläge gekennzeichnet. Daher wurden die Primer für die weitere Analyse wieder verdünnt angewandt.

In einem weiteren Test wurde mit dem Isolat einer rezenten Speichelprobe gearbeitet. Die Multiplex-Primer wurden in einer Verdünnungsstufe von 1:10 und SBE-Primer von 1:50 eingesetzt. Beide PCR-Schritte wurden im Singleplexverfahren durchgeführt. Die aus der Kapillarelektrophorese erhaltenen Elektropherogramme zeigten bessere Signale, die nicht mehr erhöht waren. Es waren keine Farbdurchschläge mehr erkennbar und auch die Peaks konnten gut zugeordnet werden. Im Bereich von 20-30 bp waren allerdings bei fast allen Profilen anomale Peaks zu erkennen. Die für diese Arbeit acht relevanten SNP-Positionen (G709A-R, T5442C, A7055G-R, C7256T, C10400T, T10873C, G769A-R, T2416C) zeigten jedoch eindeutige Profile und gute Signalstärken, sodass im Weiteren nur noch diese acht mtSNPs in die Analysen einbezogen wurden.

In einem letzten Ansatz wurden die acht mtSNP-Positionen mit DNA-Proben des Probensets aus Afrika getestet. Die Multiplex und SBE-Primer wurden mit einer Verdünnungsstufe von 1:10 verwendet. Beide PCR-Schritte wurden im Multiplexverfahren durchgeführt. Das Analyseergebnis zeigte für alle Proben sehr gute Signalverläufe. Ein Beispielverlauf für eine Probe ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

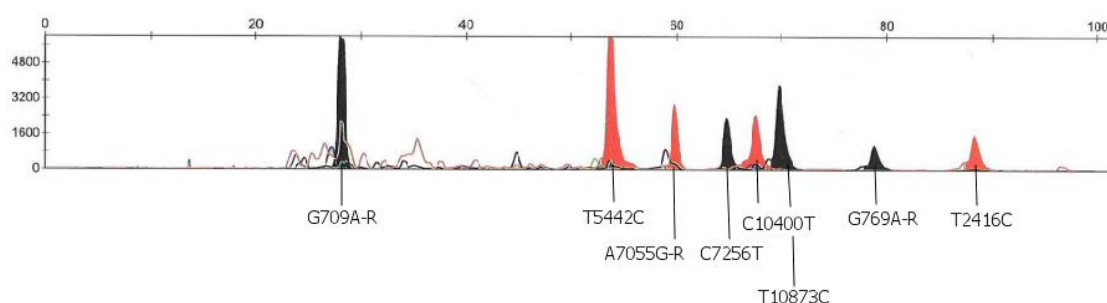


Abbildung 7: Funktionalitätsanalyse der Primer am Beispiel eines DNA-Isolates aus Äthiopien

Die Abbildung zeigt den vollständigen Profilverlauf aus dem mtSNP-System von Paneto et al. mit allen 8 analysierten Loci für ein DNA-Isolat aus Äthiopien. Die Marker konnten den Peaks im Elektropherogramm erfolgreich zugeordnet werden. In der Nomenklatur wird der Wildtyp der Markerbezeichnung vorangestellt und die Allelausprägung des Polymorphismus wird angehängen.

Die Zuordnung der Peaks war eindeutig möglich. Es traten keine unspezifischen Signale oder Farbdurchschläge auf. Die Funktionalitätsanalysen wurden beendet und die mtSNP-Analyse zur Haplogruppenklassifikation begonnen. Ausgehend von den Signalstärken wurde dort ein Verdünnungsfaktor von 1:10 für die Analyse-Primer übernommen.

5.2 Analysen des mtSNP-Systems

Schwerpunktmäßig war das Ziel der Arbeit die acht mtSNP-Positionen, die den Afrika-Zweig im Haplogruppenbaum widerspiegeln, zu analysieren.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 49 Proben von Ghana und 50 Proben aus Äthiopien ausgewählt. Die Analyse der mtSNPs wurde auf alle Proben gleichermaßen nach denselben Reaktionsbedingungen durchgeführt. Durch die Einhaltung einer gleichbleibenden Menge an DNA-Volumen für die Multiplex-PCR und einheitlichen Primerkonzentrationen sollten gleiche Bedingungen gewährleistet werden. Aufgrund der Minisequenzierung und der kapillarelektrophoretischen Untersuchung konnten die mtSNPs analysiert und detektiert werden. Mithilfe der GeneMapper ID Software 2.0 erfolgte die Auswertung der Elektropherogramme.

Anhand der Vorversuche konnte eine optimale Verdünnungsstufe der Primer ermittelt und auf alle Proben angewandt werden. Die Multiplex- und SBE-Primer wurden in jedem Ansatz in einer 1:10 Verdünnung verwendet. Informationen über die Konzentration der mtDNA in den Isolaten standen nicht zur Verfügung, jedoch wurde für jede Probe in der Multiplex-PCR ein Volumen von 3 µl DNA-Isolat eingesetzt.

Die Elektropherogramme aller Proben-Profile zeigten einen eindeutigen Signalverlauf. Die Peaks konnten den mtSNP-Positionen exakt zugeordnet werden (Abbildung 8).

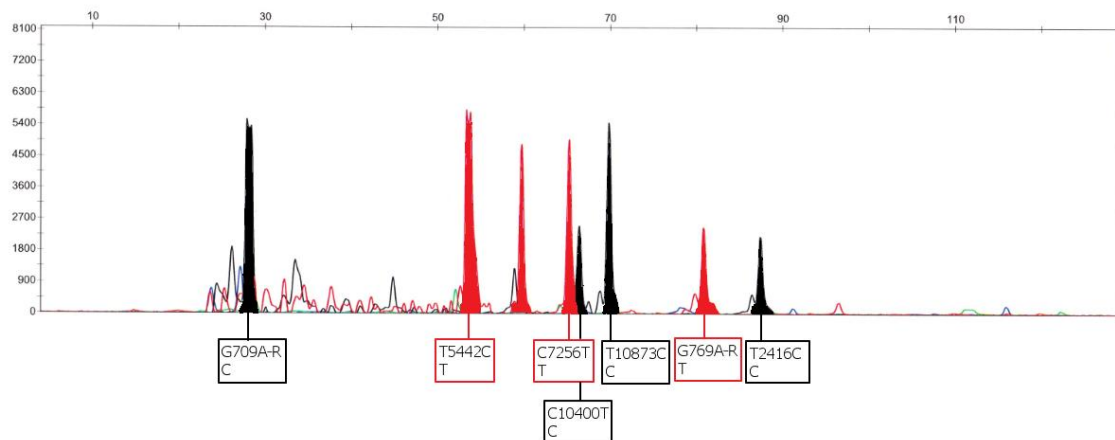


Abbildung 8: Multiplexamplifikation mit einem mtSNP-System für 8 Loci

Die Abbildung zeigt einen vollständigen Profilverlauf eines äthiopischen DNA-Isolats. Die acht mitochondrialen Marker wurden erfolgreich in dem beschriebenen mtSNP-System amplifiziert. In der Nomenklatur wird der Wildtyp der Markerbezeichnung vorangestellt und die Allelausprägung des Polymorphismus wird angehängen. Des Weiteren wird die Allelausprägung der Position mit angegeben.

Zwischen den Proben aus Ghana und Äthiopien wurden keine Unterschiede in den Signalverläufen deutlich. Auch gab es keine Schwankungen zwischen den Ergebnissen der Chelex-extrahierten DNA und der DNA, die mittels PCI isoliert wurde.

In den Profilverläufen traten keine unspezifischen Peaks auf, was die Auswertung erleichterte.

Die Elektropherogramme wiesen eine ausgeprägte Fluoreszenzintensität auf. Die Signalstärken aller Pherogramme waren für die Positionen G769A-R und T2416C im Gegensatz zu den restlichen sechs Positionen niedriger, jedoch immer deutlich erkennbar.

Die Auswertung aller Elektropherogramme wurde in der Abbildung 13 tabellarisch zusammengefasst. In dieser wurde für alle Proben die Allelausprägung jeder mtSNP-Position festgehalten.

Ausschließlich für den Marker T5442C gab es bei drei Proben einen Allelausfall. Weiterhin war nur bei der SNP-Position G709A-R in zwei Fällen keine eindeutige Allelzuordnung möglich.

Die Marker G709A-R, T5442C, A7055G-R und C10400T traten in ihrer Ausprägung überwiegend im Wildtyp auf und nur ein Bruchteil der Proben wies bei den Markern den Polymorphismus auf. Dabei zeigten die Profile für G709A-R und C10400T in den Verläufen vordergründig das Nukleotid Cytosin auf und die Verläufe für T5442C und A7055G-R wiesen vorrangig das Nukleotid Thymin in der Detektion auf.

Ausschließlich ein einzelner Marker (T10873C) zeigte in den Profilverläufen hauptsächlich die Ausprägung in Form des Polymorphismus. So traten nur 11 der 99 Proben mit dem Nukleotid Thymin auf, was dem Wildtyp entspricht.

Bei den restlichen drei SNP-Markern (C7256T, G769A-R, T2416C) wurde eine relativ gleichmäßige Verteilung in den Ausprägungen zwischen Wildtyp und Polymorphismus beobachtet.

Die Position A7055G-R zeigte für etwa 1/3 der Proben eine Heteroplasmie (Abbildung 9). An dieser Stelle wurden. Die Koexistenz von mutierter und normaler mtDNA in einer Zelle wird als Heteroplasmie bezeichnet [URL-5].

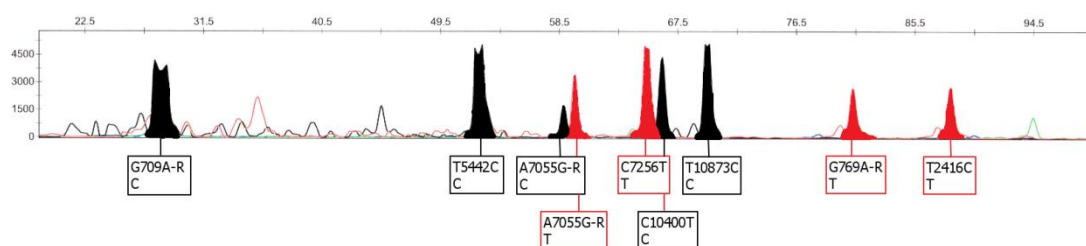


Abbildung 9: Multiplexamplifikation mit Heteroplasmie

Der Signalverlauf zeigt in der Amplifikation der 8 polymorphen Loci des SNP-Systems für die Position A7055G-R eine Heteroplasmie. Hier ist die Ausprägung vom Wildtyp mit Thymin sowie der Polymorphismus mit Cytosin aufgetreten. Die Analyse wurde mit einem Isolat aus Ghana durchgeführt. In der Nomenklatur wird der Wildtyp der Markerbezeichnung vorangestellt und die Allelausprägung des Polymorphismus angehängen. Darüber hinaus wurde die Nukleotid-Ausprägung der Position mit angegeben.

In diesen Fällen wurden in den Elektropherogrammen für diesen Marker beide möglichen Allelzustände (Wildtyp und Polymorphismus) detektiert.

5.3 Haplogruppenklassifikation

Mithilfe der Ausprägungen der SNP-Positionen, die in der Kapillarelektrophorese detektiert und analysiert wurden, kann eine Einteilung in Haplogruppen erfolgen. Als Grundlage dient der Hg-Klassifikationsbaum aus Abbildung 5.

Für die Einteilung wurden zunächst die Schlüsselpositionen C10400T und T10873C betrachtet. Durch Ausprägungen im Wildtyp und Polymorphismus und die Betrachtung der beiden Positionen in Kombination, konnte eine erste grobe Einteilung in die Haplogruppen L3, N* und M* erfolgen.

Proben bei denen in der Analyse für die Position C10400T das Nukleotid Thymin und gleichzeitig für die Position T10873C das Nukleotid Cytosin detektiert wurde, wurden der Gruppe M* zugeordnet. Es konnten 11 Proben in diese Gruppe eingeordnet werden (Abbildung 10).

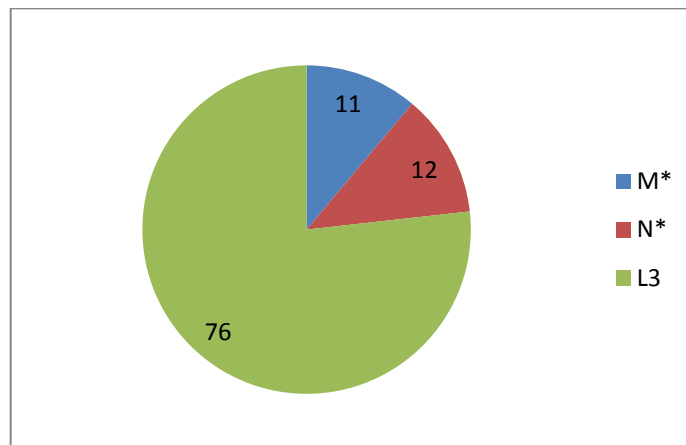


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Makrohaplogruppen

Im Diagramm ist die Verteilung der Makrohaplogruppen nach Probenanzahl zu sehen. Hier erfolgte zunächst nur die Einteilung der Proben in die Haupthaplogruppen L3, M* und N* nach dem Hg-Klassifikationsbaum von [Paneto et al., 2012].

Wenn der Marker C10400T in der Untersuchung ein Cytosin auswies und T10873C Thymin wurden die analysierten Proben der Haplogruppe N* zugeordnet. Dies traf auf 12 der 99 Proben zu. Treten diese beiden Marker in ihrer Kombination mit dem Nukleotid Cytosin auf, wurden die Proben der Haplogruppe L3 zugeteilt, was für 76 Proben zutraf. Da in dieser Analyse weitere Positionen betrachtet werden, erfolgte die weitere Klassifikation dieser Proben in Subhaplogruppen. Es wurde eine weitere Untergliederung in die fünf Untergruppen vorgenommen (Abbildung 11). Diese Untergliederung konnte allerdings nur stattfinden, wenn die Marker G769A-R und C7256T mit einem Thymin detektiert wurden. Dies traf auf 38 Proben zu, welche im Anschluss den Subhaplogruppen L6, L2, L1, L0 und L5 zugeteilt wurden. Sofern neben den beiden genannten Markern, die Position G709A-R in der Untersuchung das Nukleotid Thymin besaß, wurde die Probe in L6 eingeordnet. Diese Voraussetzungen

entsprachen sechs der getesteten Individuen. Wenn dem nicht so war und stattdessen für den SNP-Marker T2416C das Nukleotid Cytosin dokumentiert wurde, wurde die Probe L2 zugewiesen. Dieser Gruppe wurden 23 Proben zugeteilt. Sobald auch dies nicht zutraf und A7055A-R als Cytosin detektiert wurde, erfolgte die Zuteilung in L1. Keine der Proben wurde dieser Gruppe zugeordnet. In L0 wurde eine Probe eingeordnet, sobald G709A-R, T2416C, A7055A-R nicht mit den entsprechenden Ausprägungen detektiert wurden und T5442C gleichzeitig das Cytosin aufwies. Mit diesem Hintergrund wurden fünf Proben der Gruppe L0 zugeteilt. Falls all diese Voraussetzungen nicht zutrafen, erfolgte die Zuordnung zu L5, was für zwei analysierte Proben eintraf.

Es wurde beobachtet, dass der Gruppe L6 ausschließlich Proben aus Ghana zugeordnet wurden, ansonsten wurden keine Unterschiede in der Haplogruppenklassifikation zwischen Ghana und Äthiopien festgestellt.

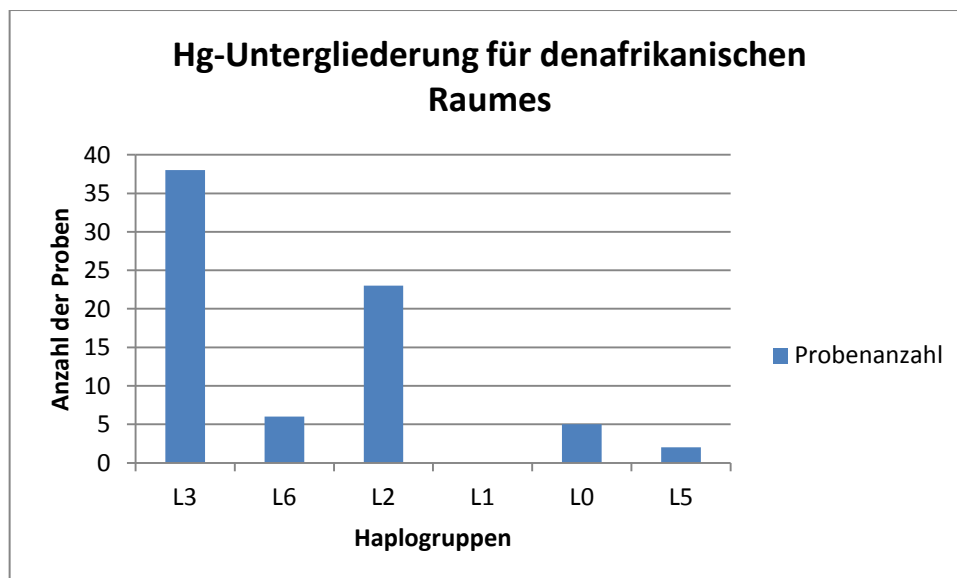


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Hg-Verteilung für den afrikanischen Raum

Im Diagramm ist die weitere Verteilung der Haplogruppen für den afrikanischen Teilzweig nach Probenanzahl zu sehen. Die Anzahl der Proben (y-Achse) wurden gegen die Haplogruppen (x-Achse) aufgetragen. Hier wurden die Proben in die Haplogruppen L3, L6; L2, L1, L0 und L5 nach dem Hg-Klassifikationsbaum von [Paneto et al., 2012] eingeteilt.

6 Diskussion

6.1 Vorversuche und Fehleranalyse/Optimierung

Um eine Aussage über die Qualität der gDNA und mtDNA der Proben zu erlangen, wurde eine STR-Analyse, sowie die Untersuchung von 24 mitochondrialen SNPs in drei 8-plex-Systemen durchgeführt. Die STR-Analyse eignet sich dafür, um die Qualität der gDNA zu ermitteln. Mithilfe der drei Multiplex-Systeme wurde die Qualität der mitochondrialen DNA geprüft. Mit beiden Untersuchungsvarianten ergaben die Analysen auswertbare Elektropherogramme. Es konnten für beiden Analysen ausreichend hohe Signalstärken erreicht werden. Alle polymorphen Regionen der SNP-Analyse wurden bei allen Proben eindeutig zugeordnet.

Aufgrund der eindeutigen Signalverläufe und der Eindeutigkeit der Peaks in der STR-Analyse, wurde angenommen, dass die gDNA der Proben trotz ihrer Lagerzeit seit 2004 sehr gut erhalten ist.

Da auch bei den Untersuchungen der mtDNA für keinen der 24 analysierten mtSNPs ein Allelausfall oder unspezifische Peaks zu beobachten waren, kann geschlussfolgert werden, dass auch die mtDNA mit einer guten Qualität in der Proben vorliegt.

Durch umfassende Testläufe mit den Primern des neuen Systems, sollten die Komponenten der Ansätze, wie zum Beispiel Primer-Konzentration aufeinander abgestimmt werden. In entsprechenden Analysen sollte ebenfalls die Wirkungsweise und Spezifität der Analyse-Primer untersucht werden.

In den ersten Analysen waren kaum allelspezifische Signale zu erkennen. Stattdessen wiesen die Profile viele unspezifische Signale auf, die zum Teil komplementär zum erwarteten SNP detektiert wurden. Auch die entsprechenden Leerkontrollen waren durch hohe Signale gekennzeichnet, die mit denen aus den Untersuchungen übereinstimmten. Daher wurde die Überlegung gemacht die Sequenzen der Analyse-Primer zu überprüfen und auf ihre Bindspezifität zu untersuchen. Die Überprüfung mit nBlast lieferte allerdings keine negativen Ergebnisse, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass die Primer spezifisch an der template DNA binden und diese korrekt amplifizieren. Daher wurde angenommen, dass sich eventuell Sekundärstrukturen ausgebildet haben, die nun mit der Kapillarelektrophorese detektiert wurden und diese unspezifischen Peaks hervorriefen. Mit der Software AutoDimer konnte ausgeschlossen werden, dass Hybridisierungen (Selbsthybridisierung, cross-Hybridisierung) der Sequenzen oder die Ausbildung von Sekundärstrukturen aufgetreten sind.

Aus diesem Grund wurden die Amplifikationsbedingungen für die weiteren Analysen an denen aus der Literaturstelle [Paneto et al., 2012] angepasst und das Amplifikationsprotokoll von [Pflugbeil, 2012] verworfen. Das neu angewandte

Protokoll variierte verschiedene Annealingtemperaturen der Primer. Da alle Primer unterschiedliche Anlagerungstemperaturen besitzen, könnten in diesem Punkt die ungenauen Profile begründet liegen. Jeder Primer weist ein eigene Annealingtemperatur auf, bei der er optimal bindet und die Amplifikation erfolgreich stattfindet. Durch die Anpassung des Protokolls wurden die individuellen Annealingtemperaturen gewährleistet. Aufgrund der weiteren Ergebnisse wurde diese Annahme bestätigt. Die Profile zeigten Signalverläufe, die den entsprechenden Loci zugeordnet werden konnten. Diese Profile waren allerdings von Farbdurchschlägen gekennzeichnet. Dadurch steigen die Farben der anderen Marker mit an und können falsch-positiv als Peak identifiziert werden. Farbdurchschläge entstehen, wenn ein Marker zu stark fluoresziert, was durch die Anpassung der Primerkonzentrationen und der eingesetzten DNA eliminiert werden kann.

Demzufolge wurde die Primerkonzentration angepasst und die Primer nicht mehr unverdünnt eingesetzt. Damit konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Die Signale waren besser zuzuordnen und die Signalintensitäten nicht mehr so hoch, dass es zu Farbdurchschlägen kam. Daher wurde die Verdünnungsstufe von 1:10 für die weiterführenden Untersuchungen übernommen.

Auch die Analysen, die ausschließlich mit den acht relevanten SNP-Markern durchgeführt wurden, zeigten in ihren Profilverläufen gute Ergebnisse. Nachdem keine der getesteten Proben Allelausfälle oder unspezifische Peaks aufwies wurde das System mit den acht Positionen als stabil angenommen. Die Anwendung der entsprechenden Amplifikationsbedingungen erwies sich als erfolgreich.

6.2 Analysen des mtSNP-Systems

Während umfassender Testläufe wurden die Amplifikationsparameter aufeinander abgestimmt und auf das mtSNP-System angewandt. Es zeigte sich, dass damit gute Resultate erzielt wurden. In den Analysen waren keine Schwankungen zu erkennen. Die Allelfluoreszenzintensitäten der einzelnen Marker zeigten für die jeweiligen Proben keine großen Unterschiede und blieben immer mit minimalen Schwankungen im gleichen Bereich. Einzig bei dem SNP-Marker T5442C gab es bei drei Proben einen Allelausfall und nur bei der SNP-Position G709A-R war in zwei Fällen keine eindeutige Allelzuordnung möglich. Es wurde nicht davon ausgegangen, dass dies in der Amplifikation begründet liegt, da es nur bei den beiden Positionen und insgesamt lediglich fünf Proben vorgekommen ist. Bei den Proben mit Allelausfällen könnte ebenso der zu untersuchende Sequenzabschnitt degradiert vorliegen, sodass die Analyse-Primer nicht komplementär binden können.

Ein Großteil der Marker lag entweder überwiegend im Wildtyp oder in einem ausgewogenen Verhältnis zwischen Polymorphismus und Wildtyp vor. Nur die SNP-Position T10873C zeigte bei der Analyse der Profilverläufe hauptsächlich die Ausprägung des Polymorphismus.

Bei etwa 1/3 der Proben konnte für die Position A7055G-R eine Heteroplasmie beobachtet werden, bei der in den Profilen für diese Position sowohl der Wildtyp, als auch der Polymorphismus gleichzeitig auftauchten. Dabei werden Verunreinigungen ausgeschlossen, da dieses Phänomen für nur eine Position detektiert wurde und sich auf mehrere, zeitlich voneinander getrennt durchgeführte Versuchsansätze erstreckt. Auch die Verunreinigung der Proben bei der Entnahme und Isolation wird ausgeschlossen, da davon die Proben aus Äthiopien und Ghana gleichermaßen betroffen sind und sich kein Trend zu einer der Bevölkerungsgruppen hin abgezeichnet hat.

Das System kann für die Analyse von mtSNP-Positionen in dieser Zusammenstellung genutzt werden und liefert dabei verwertbare Ergebnisse.

6.3 Haplogruppenklassifikation

Mittels der untersuchten polymorphen Regionen konnte eine grobe Einteilung in die Haplogruppen erfolgen. Dabei wurde unerwarteter Weise deutlich, dass die aus den Afrika-Proben gewonnenen Ergebnisse nicht wie angenommen in den afrikanischen Zweig des Haplogruppenbaums abzielen, sondern auch in die asiatischen und europäischen Äste führen. Diesen beiden Richtungen wurde etwa die gleiche Anzahl an Individuen zugeteilt. Allerdings ist die Haplogruppenklassifikation auf Basis des angegebenen Baumes zu grob. Für eine konkrete Zuordnung zu der Gruppe M* oder N* müssten weitere Positionen analysiert werden. Weiterhin könnten in diesen Fällen auch zwei mtDNA-Varianten vorliegen, wobei im Rahmen dieser Analysen nur eine zum Vorschein gekommen ist. Wäre dies der Fall, besteht die Möglichkeit, dass diese andere Variante in eine andere Verzweigung des Haplogruppenbaums führt. Um die Diskriminationskraft zu erhöhen und eine geographische Zuordnung zu ermöglichen, müssten die einzelnen Haplogruppen M* und N* in ihren Positionen weiter aufgeschlüsselt werden und die entsprechenden Positionen in fortführende Studien mit einbezogen werden [URL-1].

Die hier vorgenommene Einteilung in Haplogruppen ist nur grob und damit kann keine allgemein repräsentative Aussage getroffen werden. Damit eine statistische Aussage gemacht werden kann, müsste ein entsprechend großes Set an Proben analysiert werden und in diese Betrachtungen müssten mehr Marker mit Hintergrundinformationen zum Haplogruppenbaum einfließen [Parson & Bandelt, 2006].

7 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend kann aus den erhaltenen Ergebnissen geschlossen werden, dass das eingeführte mtSNP-System für Analysen der mitochondrialen DNA geeignet ist und als Grundstein für fortführende Analysen dienen kann. Ein entscheidender Vorteil dieser Untersuchungen liegt in der Minisequenzierung und Kapillarelektrophorese. Durch die Anwendung dieser Methoden können in einem Ansatz mehrere Loci amplifiziert und detektiert werden. Um so eine hohe Aussagekraft wie mit STR-Untersuchungen zu erreichen, muss für die Untersuchung allerdings ein größeres Set an polymorphen Regionen gewählt werden.

Für fortführende phylogenetische Studien ist es sinnvoll parallel zu den SNP-Untersuchungen STR-basierte Analysen zu erheben. Damit kann die Haplogruppen-Entwicklung und -Verteilung über die Zeit überprüft werden. Denn mtDNA liefert andere Informationen als genomische DNA. Mithilfe der mtSNPs können lediglich die Mutationsereignisse der mtDNA und die daraus resultierende Entwicklung der Haplogruppen untersucht werden. Diese Erkenntnisse können dann mittels der STR-Analysen abgeglichen und vervollständigt werden.

Um bei der Haplogruppenklassifikation signifikante Ergebnisse zu erzielen und repräsentative Aussagen treffen zu können, ist es immer besser, ein großes Set an Untersuchungsmaterial von verschiedenen Bevölkerungsgruppen zur Verfügung stehen zu haben. Es sollten so viel Daten und Informationen wie möglich aus diversen Populationen mithilfe verschiedener molekularer Marker gesammelt und in frei zugänglichen Datenbanken hinterlegt werden.

Literaturverzeichnis

Anderson, S.; Bankier, A. T. et al. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 5806: 457–465.

Brandstätter, A.; Parsons, T. J.; Parson, W. (2003): Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *International Journal of Legal Medicine* 5: 291–298.

Buselmaier, W.; Tariverdian, G. (2006): *Humangenetik für Biologen*. [Online-Ausg.]: Springer

Budowle, B.; Van Daal, A. (2008): Forensically relevant SNP classes. In: *Biotechniques* 44

Butler, J. M. (2012): *Advanced topics in forensic DNA typing*. Elsevier Academic Press

Carracedo, Á.; Butler, J. M. et al. (2013): New guidelines for the publication of genetic population data. *Forensic Science International: Genetics* 2: 217–220.

Ganten, D.; Ruckpaul, K.; Aretz, S. (2008): *Grundlagen der Molekularen Medizin*. 3., überarbeitete und erw. Aufl: Springer Medizin

Knoop, V.; Müller, K. (2009): *Gene und Stammbäume*. 2. Aufl: Spektrum, Akad.-Verl.

Paneto, G. G.; Köhnemann, S. et al. (2011): A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion* 2: 296–302.

Parson, W. (2009): Bedeutung der mtDNA-Analyse für forensische Fragestellungen. *Rechtsmedizin* 3: 183–194.

Parson, W.; Bandelt, H.-J. (2006): Extended guidelines for mtDNA typing of population data in forensic science. *Forensic Science International: Genetics* 1: 13–19.

Pflugbeil, A.-M. (2012): Etablierung mitochondrialer SNPs Etablierung mitochondrialer SNPs in der molekulargenetischen Forensik. 97 Seiten, Mittweida, Hochschule Mittweida, Mathematik, Naturwissenschaft, Informatik, Masterarbeit.

Schwartz, M.; Vissing, J. (2002): Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New Engl J Med* 347

Vallone, P. M.; Just, R. S. et al. (2004): A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *International Journal of Legal Medicine* 3: 147–157.

[URL-1] (15.03.2014): <http://www.phylotree.org/>

[URL-2] (20.03.2014): Course Introduction
URL: http://www.nfstc.org/pdi/Subject00/pdi_s00.htm

[URL-3] (20.03.2014): DocCheck Medical Services GmbH Kapillarelektrophorese - DocCheck Flexikon
URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Kapillarelektrophorese>

[URL-4] (25.03.2014):
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>

[URL-5] (26.03.2014)- https://www.mpg.de/6684141/MPI_Age_JB_2013?c=7291742

Anhang

Tabelle 19: Eingesetzte Multiplex-Primer [Paneto et al., 2011]

Die Tabelle enthält alle Primersequenzen, die für die Amplifikation der gewünschten mitochondrialen DNA-Abschnitte im Multiplexverfahren verwendet wurden. Dabei sind all die Primer farblich markiert, die speziell in dieser Arbeit für die Analysen eingesetzt wurden. In der Tabelle finden sich neben der Primerbezeichnung noch Angaben zur Sequenzabfolge, zum Polymorphismus und zur Amplikongröße.

SNP-Position	Primer Name	Sequenz (5'-->3')	Amplikongröße (Bp)
G709A und G769A	mtG709A-FWD	AAGATTACACATGCAAGCATCC	112
	mtG709A-REV	CTAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	
G1719A; A1811G and A1736G	mtG1719+1811A-FWD	CTTGACCGCTCTGAGCTAAA	196
	mtG1719+1811A-REV	GCAGAAGGTATAGGGGTTAGTCC	
T2416C	mtT2416C-FWD	CAGCCCAATATCTACAATCAACC	114
	mtT2416C-R	GTAAGATTTGCCGAGTTCCT	
A2706G and C2772T	mtA2706G+C2772T-FWD	ACTTTTAACCAAGTAAAATTGACCT	157
	mtA2706G+C2772T-REV	GCCCCAACCGAAATTTTAA	
G3010A	mtG3010A-FWD	ACCTCGATGTTGGATCAGGACA	55
	mtG3010A-REV	CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	
G3915A	mtG3915A-FWD	TAGCAGAGACCAACCGAACC	80
	mtG3915A-REV	GGCGTATTCGATGTTGAAGC	
G4580A	mtG4580A-FWD	CGCTAAGCTCGCACTGATTT	130
	mtG4580A-REV	TTTTGGTTAGAACTGGAATAAAAGC	
C4883T	mtC4883T-FWD	CCTTTCACCTCTGAGTCCCA	128
	mtC4883T-R	GCTTACGTYTAGTGAGGGAG	
T5004C	mtT5004C-FWD	TCCATCATAGCAGGCAGTTG	124
	mtT5004C-REV	TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	
T5442C	mtT5442C-FWD	AATCTACTCCACCTCAATCAC	125
	mtT5442C-R	GTAGGAGTAGCGTGGTRAGG	
T6365C and T6392C	mtT6365C+T6392C-FWD	TGGAGCCTCCGTAGACCTAA	110
	mtT6365C+T6392C-REV	TGGCAGGGGGTTTTATATTG	
R-T6776C	mtT6776C-FWD	TGGCTTCCTAGGGTTTATCG	83
	mtT6776C-REV	CGGAGGTGAAATATGCTCGT	
C7028T and A7055G	mtC7028T-FWD	AGCAAACCTCATCACTAGACATCG	94
	mtC7028T-REV	GATGGCAAATACAGCTCCTATTGA	
C7256T	mtC7256T-FWD	TCTTCCCACAACACTTTCTC	109
	mtC7256T-R	GAGAAATGAATGAGCCTACAG	
A8251G and 8281del9bp	mtG8251A-FWD	CATGCCCATCGTCCTAGAAT	113
	mtDEL8281-9-R	TGCTAAGTTAGCTTTACAGTGG	
T8404C	mtT8404C-FWD	CAGTGAAATGCCCAACTAAA	126
	mtT8404C-REV	TTTGGTGAGGGAGGTAGGTG	

G8697A	mtG8697A-FWD	CCAACAATGACTAATCAAACCTAACC	80
	mtG8697A-REV	GTATAAGAGATCAGGTTTCGTCCTTT	
G9055A and A9066G	mtG9055A+A9066G-FWD	CGCCTAACCGCTAACATTACT	100
	mtG9055A+A9066G-REV	TGATAAGTGTAGAGGGAAGGTTAATG	
C10400T	mtC10400T-FWD	GCCCTAAGTCTGGCCTATGA	90
	mtC10400T-REV	TGAGTCGAAATCATTCTGTTTTG	
T10873C	mtT10873C-FWD	AATCAACACAACCACCCACA	90
	mtT10873C-REV	GGGGAACAGCTAAATAGGTTG	
A11251G	mtA11251G-FWD	CGCAGGCACATACTTCCTATTC	90
	mtA11251G-REV	AGTGAGCCTAGGGTGTGTGAG	
A11812G	mtA11812G-FWD	TCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCT	63
	mtA11812G-REV	GGCTTGCTAGAAGTCATCAAAAA	
G12372A	mtG12372A-FWD	AAAAATTTTGGTGCAACTCCA	107
	mtG12372A-REV	AACGAGGGTGGTAAGGATGG	
C12705T	mtC12705T-FWD	CCCAAACATTAATCAGTTCTTCAA	91
	mtC12705T-REV	GAACAGTTGGAATAGGTTGTTAGC	
C12858T	mtC12858T-FWD	ATGATACGCCCCGAGCAGA	126
	mtC12858T-REV	TGTGGGTCTCATGAGTTGGA	
A13263G	mtA13263G-FWD	CCCACTAATCCAACTCTAACAC	145
	mtA13263G-R	GCCGATTGTAACCTATTATGAGTCC	
G13708A	mtG13708A-FWD	CGCTTCCCCACCTTACTA	119
	mtG13708A-REV	GCGGGGGAAATGTTGTTAG	
T14470A	mtT14470A-FWD	CCCCATGCCTCAGGATACTC	126
	mtT14470A-REV	TTAGGGGGGAATGATGGTTG	
C14766T and T14798C	mtC14766T-FWD	CAACTACAAGAACACCAATG	82
	mtC14798C-REV	ATCATGCGGAGATGTTGGAT	
A15607G	mtA15607G-FWD	TCTCCGATCCGTCCCTAAC	55
	mtA15607G-REV	GATAGTAATAGGGCAAGGAC	
C15904T	mtC15904T-FWD	TACTCAAATGGGCCTGTCCT	86
	mtC15904T-REV	TGATTTGTCCTTGAAAAAGGT	
T16362C	mtT16362C-FWD	TAGCACATTACAGTCAAATCCC	151
	mtT16362C-R	GGATATTGATTTACGGAGGA	
T16519C	mtT16519C-FWD	CCATAACACTTGGGGGTAGC	99
	mtT16519C-REV	TTATTTAAGGGGAACGTGTGG	

Bezeichnung	Polymorphism us	Sequenz (5'→3')	Länge [mer]
R-G709A-SNP	G709A-R	TTTAGAGGGTGAACCTCACTGGAA	23
C7028T-SNP	C7028T-F	ACTACAGACACGTACTACGTTGTAGC	27
A15607G-SNP	A15607G-F	AGTCTGACAACCTCGATCCGTCCTTAACA	30
SP-R-A1736G	A1736G-R	CAATTTCAATTTTCTATCGCTATATCTTAT	30
R-C2772T-SNP	C2772T-R	GCTGACAAGGTTTGGTAGTTAGGACCTGT	31
SP2-C4883T	C4883T-F	GTGAAAGTCTGACAAACATGACAAAACCTAGCCCC	35
R-G3915A-SNP	G3915A-R	GTATTCGATGTTGAAGCCTGAGACTAGTTGGACTC	36
A11812G-SNP	A11812G-F	TGAAAGTCTGACAACCTCTCAAGGACTTCAAACCT	37
T5004C-SNP	T5004C-F	CGTGAAAGTCTGACAAACCAACCCCA GCTACGCCAAATC	38
R-T16519C-SNP	T16519C-R	CGTGAAAGTCTGACAACCTGAGGCTATTTAGGCTTTATG	38
SP-A13263G	A13263G-F	GTGCTGAAAGTCTGACAAGGCTTCTCCACTTCAAGTCA	38
T6365C-SNP	T6365C-F	ACGTGCTGAAAGTCTGACAACCTCTCTACACCTAGCAGG	42
R-A2706G-SNP	A2706G-R	GCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGGCTTCTGCTTCTGCTGT	44
R-C15904T-SNP	C15904T-R	ACGTGCTGAAAGTCTGACAACCGTTTACAAGACTGGTGATTA	44
T6392C-SNP	T6392C-F	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTCTATCTTAGGGGCCATCA	47
SP-A8251G new	A8251G-F	CCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTTCCCTTAAATCTTTGAAATAGG	47
G9055A-SNP	G9055A-F	TAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTCATGCACTAAATTGGAAGC	50
T6776C-SNP	T6776C-R	TGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGTCTACGCTATTCTCTACTGTAATAT	51
R-G8697A-SNP	G8697A-R	GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGTCTTCTTAGTGTGTTATGGTTAT	51
SP2-T5442C	T5442C-F	TAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCAACCAACCCCA	52
C12858T-SNP	C12858T-F	AACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGCAGCCTTCAAGCAATCTCTATA	55
G13708A-SNP	G13708A-F	GACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTAAACCCATTAAAGCCTG	56
SP2-R-A7055G	A7055G-R	CTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTATGATGGCAATACAGC	57
SP2-del8281	8281del9bp-F	CTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTATACACCCCTCTTA	57
A11251G-SNP	A11251G-F	AACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTCCCTACTCATCGACT	60
T8404C-SNP	T8404C-F	ACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTACCTATGCCCCACCTAAT	61
A1811G-SNP	A1811G-F	AACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGCAAGGGAAGATGAAAAATTATA	64
SP2-C7256T	C7256T-F	CAAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACGATGCATACACATGAAA	64
C10400T-SNP	C10400T-F	ACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTGACTACAAAGGATAGACTGARC	65
T10873C-SNP	T10873C-F	GACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACGCTTAATTATTAGCATCATCCC	69
R-A9066G-SNP	A9066G-R	GACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATAGAGGGAAGGTTAATGTTGATAT	70
G4580A-SNP	G4580A-F	ACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAATTACTGAGTAGGCTAGAAATAAACAT	72
R-C12705T-SNP	C12705T-R	CAAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAGGTAAGATAGTATGTTAGTAAAGAA	73
C14766T-SNP	C14766T-F	GAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCAATGACCCCAATACGCAAAA	76
SP2-R-G769A	G769A-R	CGTGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAAGCTTTGAGCTGCATTG	78
R-G3010A-SNP	G3010A-F	CGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAACCTCGATGTTGGATCAGGACATCCC	80
R-T14470A-SNP	T14470A-R	TCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAATTTATTTAGGGGAATGATGGTTGTTCTTTGG	81
G12372A-SNP	G12372A-F	CGTGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACTACTATACACACCTAACCT	82
T14798C-SNP	T14798C-F	CGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCCCTTAATAAATTAACCACTCA	83
G1719A-SNP	G1719A-F	AACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAAGCTGCGTGAAGCTGTGACAAACCTTACTACACGACAACTTA	84
SP2-T16362C	T16362C-F	CCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAATACAGTCAAACTCCCTCTYG	84
SP3-T2416C	T2416C-F	TGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACTGACTAACTAGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCAACCAAGTCATTATACCC	87

Abbildung 12: Eingesetzte SNaPshot-PCR-Primer [Paneto et al., 2011]

Die Tabelle enthält alle Primersequenzen, die für die SNaPshot-PCR nach Paneto et al. genutzt wurden. Dabei sind alle Primer farblich markiert, die speziell in dieser Arbeit für die Analysen verwendet wurden. In der Tabelle finden sich neben der Primerbezeichnung noch Angaben zur Sequenzabfolge, zum Polymorphismus und zur Primerlänge der Oligonukleotide.

			C	T	A	G					
			Paneto et al.								
Probe	Probenansatz	Datum Amplifikation	G709A*	T5442C	A7055G*	C7256T	C10400T	T10873C	G769A*	T2416C	
1A.1	86_m_Amharen_0,27	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
1A.2	58_m_Amharen_0,37	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
1A.3	200_w_Amharen_0,37	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
1A.4	246_w_Amharen_0,4	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
1A.5	234_w_Amharen_0,5	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
1A.6	238_w_Amharen_0,5	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
1A.7	239_w_Amharen_0,5	06./07.01.14	C	T	T	C	T	C	C	T	
1A.8	240_w_Amharen_0,5	06./07.01.14	T	T	T	C	C	T	C	T	
1A.9	243_w_Amharen_0,5	06./07.01.14	C	C	T	T	C	C	T	T	
1A.10	259_m_Amharen_0,5	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
2G.1	61_m_Ghana_0,9	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
2G.2	44_w_Ghana_1,0	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
2G.3	2_w_Ghana_1,1	06./07.01.14	C	T	T	C	T	C	C	T	
2G.4	72_w_Ghana_1,1	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
2G.5	96_w_Ghana_1,1	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
2G.6	168_m_Ghana_1,1	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
2G.7	88_w_Ghana_1,2	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
2G.8	41_w_Ghana_1,4	06./07.01.14	C	T	T	T	C	C	T	C	
2G.9	134_w_Ghana_1,6	06./07.01.14	C	T	T	C	C	C	C	T	
2G.10	68_w_Ghana_1,9	06./07.01.14	C	C	T	T	C	C	T	T	
-LK	Aqua dest.	06./07.01.14									
2A.1	38_m_Amharen_0,56	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	T	T	
2A.2	51_m_Amharen_0,63	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
2A.3	97_m_Amharen_0,67	16.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
2A.4	108_w_Amharen_0,67	16.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
2A.5	22_m_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
2A.6	28_m_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
2A.7	32_w_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	C	C	T	C	T	
2A.8	95_m_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
2A.9	204_m_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
2A.10	210_w_Amharen_1,0	16.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
1G.1	33_w_Ghana_PCI_0,1	16.01.2014	T	T	T	T	C	C	T	T	
1G.2	62_w_Ghana_PCI_0,1	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
1G.3	178_w_Ghana_PCI_0,1	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
1G.4	188_w_Ghana_PCI_0,1	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
1G.5	189_m_Ghana_PCI_0,1	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
1G.6	184_w_Ghana_PCI_0,2	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
1G.7	84_w_Ghana_0,3	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
1G.8	50_w_Ghana_0,6	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	T	
1G.9	85_w_Ghana_0,7	16.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
1G.10	127_w_Ghana_0,8	16.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
-LK	Aqua dest.	16.01.2014									
3A.1	211_w_Amharen_1,0	24.01.2014	T	T	T	C	C	T	C	T	
3A.2	217_w_Amharen_1,0	24.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
3A.3	218_w_Amharen_1,0	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3A.4	228_w_Amharen_1,0	24.01.2014	C	T	T	C	C	T	C	T	
3A.5	146_m_Amharen_1,3	24.01.2014	C	T	T	C	C	T	C	T	
3A.6	56_m_Amharen_1,58	24.01.2014	C	-	T	C	C	C	C	T	
3A.7	380_w_Amharen_1,7	24.01.2014	C	T	T	C	C	T	C	T	
3A.8	138_m_Amharen_1,85	24.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
3A.9	84_m_Amharen_1,9	24.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
3A.10	30_m_Amharen_1,96	24.01.2014	C	T	T	C	T	C	C	T	
3G.1	123_w_Ghana_1,9	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.2	60_m_Ghana_2,0	24.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
3G.3	75_w_Ghana_2,3	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.4	45_w_Ghana_2,4	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.5	135_m_Ghana_2,5	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.6	11m_Ghana_2,6	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.7	57_m_Ghana_2,6	24.01.2014	T	T	T	T	C	C	T	C	
3G.8	129_m_Ghana_2,9	24.01.2014	C	T	T	C	C	C	C	T	
3G.9	59_w_Ghana_3,2	24.01.2014	C	T	T	T	C	C	T	C	
3G.10	67_w_Ghana_3,2	24.01.2014	T	T	T	T	C	C	T	T	
-LK	Aqua dest.	24.01.2014									

			Paneto et al.							
			G709A*	T5442C	A7055G*	C7256T	C10400T	T10873C	G769A*	T2416C
4A.1	3_w_Amharen_2,0	05.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
4A.2	4_m_Amharen_2,0	05.02.2014	C	-	C/T	C	C	C	C	T
4A.3	93_w_Amharen_2,0	05.02.2014	C	T	C	C	C	C	C	T
4A.4	111_m_Amharen_0,57	05.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
4A.5	39_m_Amharen_0,93	05.02.2014	C	T	C/T	C	T	C	C	T
4A.6	33_m_Amharen_1,0	05.02.2014	C	-	C/T	C	C	C	C	T
4A.7	89_w_Amharen_1,0	05.02.2014	C	T	T	C	C	T	C	T
4A.8	128_w_Amharen_1,0	05.02.2014	C	T	T	C	C	T	C	T
4A.9	177_w_Amharen_1,0	05.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
4A.10	203_w_Amharen_1,0	05.02.2014	C	T	C/T	C	T	C	C	T
4G.1	29_w_Ghana_3,7	05.02.2014	T	T	C/T	T	C	C	T	C
4G.2	183_m_Ghana_PCI_0,2	05.02.2014	?	T	C/T	T	C	C	T	T
4G.3	53_w_Ghana_0,5	05.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
4G.4	81_w_Ghana_0,9	05.02.2014	C	T	C/T	C?	C	C	C	T
4G.5	66_w_Ghana_1,2	05.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
4G.6	147_w_Ghana_1,7	05.02.2014	?	T	C/T	T	C	C	T	T
4G.7	22_w_Ghana_4,5	05.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
4G.8	3_w_Ghana_PCI	05.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
4G.9	32_m_Ghana	05.02.2014	T	T	C/T	T	C	C	T	T
4G.10	97_w_Ghana_PCI	05.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
-LK	Aqua dest.	05.02.2014								
5A.1	209_w_Amharen_1,0	10.02.2014	C	T	T	C	C	T	C	T
5A.2	87_w_Amharen_1,07	10.02.2014	C	T	C/T	C	T	C	C	T
5A.3	27_m_Amharen_1,22	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
5A.4	85_m_Amharen_1,46	10.02.2014	C	T	C/T	C	T	C	C	T
5A.5	71_m_Amharen_1,88	10.02.2014	C	C	C/T	T	C	C	T	T
5A.6	45_m_Amharen_2,08	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
5A.7	36_m_Amharen_2,12	10.02.2014	C	T	T	C	C	T	C	T
5A.8	67_m_Amharen_2,42	10.02.2014	C	T	T	C	C	T	C	T
5A.9	160_m_Amharen_2,45	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
5A.10	107_m_Amharen_2,83	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	T	T
5G.1	98_m_Ghana_PCI	10.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
5G.2	100_w_Ghana_PCI	10.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
5G.3	105_w_Ghana_PCI	10.02.2014	C	C	C/T	T	C	C	T	T
5G.4	111_m_Ghana_PCI	10.02.2014	T	T	C/T	T	C	C	T	C
5G.5	131_m_Ghana_PCI	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
5G.6	137_m_Ghana_PCI	10.02.2014	C	T	C/T	T	C	C	T	C
5G.7	152_w_Ghana_PCI	10.02.2014	C	T	C/T	C	C	C	C	T
5G.8	159_m_Ghana_PCI	10.02.2014	C	C	C/T	T	C	C	T	T
5G.9	106_w_Ghana_PCI	10.02.2014	T	T	C/T	T	C	C	T	C
-LK	Aqua dest.	10.02.2014								

Abbildung 13: Ergebnisse der Kapillarelektrophorese

Die Abbildung zeigt in tabellarischer Form die Ergebnisse der kapillarelektrophoretischen Analysen für alle Proben. In der ersten Spalte ist die Nummerierung der Proben zu erkennen, die für die Untersuchungen in Gruppen eingeteilt wurden. In zwei weiteren Spalten werden probenspezifische Angaben und das Amplifikationsdatum notiert. Die mit einem * versehenen Analyse Primer werden in Reverse Richtung zum Template-Strang synthetisiert, wodurch in der Auswertung der Elektropherogramme die komplementären Nukleotide betrachtet werden. Die detektierten Nukleotide wurden ihren Fluoreszenzmarkierungen nach kenntlich gemacht. Für die betrachteten acht Positionen variieren die Nukleotide allerdings nur zwischen Cytosin und Thymin. Thymin wurde rot markiert und Cytosin in einem Grauton. Mit einem „?“ versehen wurden Positionen bei denen keine genaue Signalzuordnung möglich war. Bei den Positionen mit den grün gekennzeichneten Flächen kam es zu Allelausfällen. Bei den violett markierten Positionen trat eine Heteroplasmie auf, wo sowohl der Wildtyp, als auch der Polymorphismus detektiert wurden.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, den 28.03.2014

Christin Lembke